

PCT

世界知的所有権機関

国際事務局



特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類6 A23J 3/08, 3/34, A23C 21/00	A1	(11) 国際公開番号 WO 96/11584 (43) 国際公開日 1996年4月25日(25.04.96)
(21) 国際出願番号 PCT/JP95/02109 (22) 国際出願日 1995年10月13日(13.10.95) (30) 優先権データ 特願平6/274303 1994年10月14日(14.10.94) JP 特願平6/274304 1994年10月14日(14.10.94) JP 特願平6/305635 1994年11月15日(15.11.94) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 森永乳業株式会社 (MORINAGA MILK INDUSTRY CO., LTD.)[JP/JP] 〒108 東京都港区芝五丁目33番1号 Tokyo, (JP) (72) 発明者: および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 島村誠一(SHIMAMURA, Seichi)[JP/JP] 田村吉隆(TAMURA, Yoshitaka)[JP/JP] 宮川 博(MIYAKAWA, Hiroshi)[JP/JP] 齋藤仁志(SAITO, Hitoshi)[JP/JP] 川口 靖(KAWAGUCHI, Yasushi)[JP/JP] 磯村奈生子(ISOMURA, Naoko)[JP/JP] 赤染陽子(AKAZOME, Yoko)[JP/JP] 越智 浩(OCHI, Hiroshi)[JP/JP]	河本美穂子(KAWAMOTO, Mihoko)[JP/JP] 〒228 神奈川県座間市東原五丁目1番83号 森永乳業株式会社 栄養科学研究所内 Kanagawa, (JP) (74) 代理人 弁理士 須藤政彦(SUDO, Masahiko) 〒130 東京都墨田区両国3丁目26番2号 リヴゴーシュA・T601 Tokyo, (JP) (81) 指定国 AU, CA, NZ, US, 欧州特許(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 国際調査報告書	
(54) Title: PEPTIDE MIXTURE AND PRODUCTS THEREOF (54) 発明の名称 ペプチド混合物及びその製品 (57) Abstract <p>A whey protein hydrolyzate having peculiar physicochemical properties, a process for producing the same, and a process for producing a peptide mixture with constant qualities. The hydrolyzate is tasty and characterized in that it is a hydrolyzate of whey proteins having a purity of at least 70 % by weight, that the content of the fractions having molecular weights of 5,000-10,000 Da is less than 1 % by weight of the hydrolyzate as a whole, that the residual antigenic activity is 10^{-5} or below as determined by the ELISA suppression test using antiwhey protein sera, that the free amino acid content of the hydrolyzate is 10-15 % by weight of the total amino acid content thereof, that the free lysine content of the whey proteins is 12-20 % by weight of the total lysine content thereof, that the ammonia content is 0.2 % by weight or below, that the transmittance of the 10 % by weight solution thereof is 98 % of above as measured using a 1-cm cell with the light of 540 nm in wavelength, that the 5 % by weight solution thereof (pH: 4 to 7) does not cause precipitation even when heated at 120 °C for 10 min, and that it has an antioxidant activity. The hydrolyzate can be used as a proteinaceous source for infants with insufficient digestivity, the aged and the sick with reduced digestivity, pregnant and praturient women, and the sick with reduced immune functions, as well as a proteinaceous source for a human milk enrichment composition and oral/enteral nutrients. Also it is possible according to the invention process to produce in a stabilized way a peptide mixture that is substantially constant in the content of each free amino acid and the total content of the free amino acids.</p>		

(57) 要約

本発明は、特異な理化学的性状を有する乳清蛋白加水分解物及びその製造法に係るものであり、更には、一定品質のペプチド混合物の製造法に関する。

上記乳清蛋白加水分解物は、純度が少なくとも70%（重量）の乳清蛋白質の加水分解物であって、分子量5,000～10,000ダルトンの画分が、全加水分解物の1%（重量）未満であること、抗乳清蛋白質血清を用いたエライザ抑制試験法により測定した抗原残存活性が 10^{-5} 以下であること、加水分解物の全アミノ酸の量に対する遊離アミノ酸の量の割合が10～15%（重量）であること、乳清蛋白質に含まれる全リジンの量に対する遊離リジンの量の割合が12～20%（重量）であること、アンモニア含量が0.2%（重量）以下であること、10%（重量）溶液を1cmのセル、540nmで測定した透過率が98%以上であること、pH4～7の5%（重量）溶液を120℃で10分間加熱して沈殿を生じないこと及び抗酸化活性を有することを特徴とする風味良好な乳清蛋白加水分解物、に係る。

上記乳清蛋白加水分解物は、消化吸收能の未熟な乳幼児又は消化吸收能が低下している高齢者、病人への蛋白質供給源用素材、乳幼児、妊産婦、免疫機能の低下した病人への蛋白質供給源用素材、また、母乳強化組成物や経口経腸栄養剤の蛋白質供給源用素材等として使用できる。

また、本発明の方法によれば、各遊離アミノ酸の量及び遊離アミノ酸の合計量がほぼ一定のペプチド混合物が常に安定して得られる。

情報としての用途のみ					
PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード					
AL	アルバニア	LK	スリランカ	PT	ポルトガル
AM	アルメニア	LR	リベリア	RO	ルーマニア
AT	オーストリア	LS	レソト	RU	ロシア連邦
AU	オーストラリア	LT	リトアニア	SE	スウェーデン
AZ	アゼルバイジャン	LU	ルクセンブルグ	SG	シンガポール
BB	バハマ	LV	ラトヴィア	SI	スロベニア
BE	ベルギー	MC	モナコ	SK	スロバキア
BG	ブルガリア	MD	モルドバ	SS	スロベニア共和国
BR	ブラジル	MG	マダガスカル	SV	エルサルバドル
BY	ベラルーシ	MK	マケドニア共和国	TD	チュニジア
CA	カナダ	ML	マリナ	TG	トゴ
CC	中東	MN	モンゴル	TH	タイ
CF	中央アフリカ共和国	MR	モーリタニア	TM	トルクメニスタン
CG	コンゴ	MW	モザンビーク	TR	トルコ
CH	スイス	MX	メキシコ	TT	トリニダード・トバゴ
CI	コートジボワール	NE	ニジェール	UA	ウクライナ
CK	クック諸島	NL	オランダ	UG	ウガンダ
CL	チリ	NZ	ニュージーランド	US	米国
CM	カメルーン	PL	ポーランド	UZ	ウズベキスタン共和国
CN	中国			VN	ベトナム
CO	コロンビア				
CR	コスタリカ				
CU	キューバ				
DE	ドイツ				
DK	デンマーク				
EE	エストニア				
FR	フランス				
GB	イギリス				
GR	ギリシャ				
GU	グアム				
HN	ホンジュラス				
IE	アイルランド				
IT	イタリア				
JP	日本				
KE	ケニア				
KR	韓国				
KP	朝鮮民主主義人民共和国				
KZ	カザフスタン				
LI	リヒテンシュタイン				

明細書

ペプチド混合物及びその製品

5 技術分野

本発明は、特異な理化学的性状を有する乳清蛋白加水分解物及びその製造法に係るものであり、腸管吸収性及びアミノ酸バランスに優れ、食餌アレルギーに対する予防及び治療効果並びに抗酸化作用を有し、風味が良好であり、広範な種々の用途に利用できる新規な乳清蛋白加水分解物及びその製造法である。

また、本発明は、所定量の遊離アミノ酸を含有したペプチド混合物を、常に安定した状態で、一定の品質で製造する方法に関するものである。

更に、本発明は、フェニルアラニンの摂取を制限する必要があるアミノ酸代謝異常症、特にフェニルケトン尿症患者が日常的に摂取することが可能であるフェニルアラニン含量の少ないペプチド混合物を、常に安定した状態で、一定の品質で製造する方法に関する。

本明細書において、百分率は透過率及び抑制率を除き、特に断りのない限り、重量による表示である。

20

背景技術

最近、消化吸収の観点から、遊離アミノ酸混合物よりもオリゴペプチドが、吸収速度及び吸収後のアミノ酸バランスにおいて優れていることが明らかにされている（酪農科学・食品の研究、第39巻、第A-283ページ、1990年）。一方、食餌蛋白質に起因するアレルギー患者が急増し、特に乳児においては乳清蛋白質、特にβ-ラクトグロブリンに起因するアレルギーが多発していることが明らかになり（酪農科学・食品の研究、第39巻、第A-283ページ、1990年）、乳児用食品中の乳清蛋白質の抗原性低減又は

乳児用食品からの乳清蛋白質抗原の実質的除去が、求められている。
。

5 乳児用食品中の乳清蛋白質の抗原性低減又は乳児用食品からの乳清蛋白質抗原の実質的除去の手段として、乳清蛋白質の加水分解が広範に採用されているが、アミノ酸遊離率の極端に低い分解物は苦味を呈する場合が多く、摂取するときの障害となることがある。また、乳清蛋白質の加水分解物は、熱に対して不安定になる場合があるので、溶液の状態では沈殿物の生成、褐変化等の不都合が生じ、従来の分解物は経口栄養剤等として利用するとき問題があった。

10 更に、乳清蛋白加水分解物を食品に使用する場合、特に脂肪と共存する食品（例えば、乳幼児用の調製粉乳では、100g当たり脂肪が27%も含まれている）においては、酸化防止が重大な問題となっている。即ち、脂肪を含有する食品においては、栄養学的な観点から飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸とのバランスが考慮されているが、
15 、特に不飽和脂肪酸は容易に酸化される欠点があり、最近、脳・神経・網膜組織の生体膜に多く含まれ、その機能発現に関与していると考えられているDHA等は、一旦酸化されると極めて強い酸化臭を放出し、製品品質に著しい悪影響を与えるため、酸化の進行防止が待望されている。

20 一方、摂取したアミノ酸がトランスグルタミナーゼ、グルタメートデヒドロゲナーゼ等によって分解されて、アンモニアが生成するが、生成したアンモニアは有毒であり、肝臓で直ちに処理される必要があり、摂取する食品にアンモニアが含有されていないことが必要である。このような点から、乳清蛋白加水分解物にも、アンモニア
25 が含有されていないことが、極めて重要である。

また、成長した動物の窒素平衡は、窒素の最低代謝量に見合う量の窒素を摂取すればよいが、この窒素を単にアンモニアとして与えても無効であり、必須アミノ酸として摂取しなければならない。そのためには、摂取する食品に必要量の必須アミノ酸が含まれてい

ければならない。

以上のような蛋白質及びアミノ酸の栄養・生理学の背景から、乳清蛋白質を酵素で加水分解した分解物を製造する種々の方法が開発されているが、それらの幾つかを例示すれば次のとおりである。

- 5 1) 乳清蛋白質をバシラス・サチリス由来のエンドペプチダーゼとトリプシンの2種類の酵素、又はバシラス・サチリス由来のエンドペプチダーゼ、トリプシン及びキモトリプシンの3種類の酵素で分解し、分子量2,000ダルトン以下、抗原残存率 10^{-4} 以下、アミノ酸遊離率が5%以下のオリゴペプチド混合物が開示されている(特開平4-248959号公報)。
- 10 2) 乳蛋白質をアルカリプロテアーゼで分解し、ジペプチド及びトリペプチドが75モル%以上、アミノ酸遊離率が5%未満、4個以上のアミノ酸からなり、かつ平均鎖長6.2のペプチドが20モル%未満の分解物が開示されている(特表平5-505304号公報)。
- 15 3) 乳清、カゼイン、大豆をペプシン、トリプシン・キモトリプシンで分解し、限外濾過し、4~10個のアミノ酸を有するペプチドが40~60%であり、分子量60,000ダルトン以下のオリゴペプチドが開示されている(特開平3-187348号公報)。
- 20 4) 乳清蛋白質を熱変性させながらpH6~10、60~80℃で分解し、酵素を加熱失活し、分子量10000ダルトン以下、メインピーク1,000~5,000、平均ペプチド鎖長3~8、遊離アミノ酸含量20%以下、 β -ラクトグロブリンの抗原性1/10,000以下の分解物が開示されている(特開平4-112753号公報)。
- 25 5) 牛乳蛋白質をトリプシン、 α -キモトリプシン、アスペルギルス属、バシラス属菌の酵素で分解し、分子量10,000ダルトン以下の経口免疫寛容誘導能を有する低アレルギー性ペプチドが

開示されている（特開平 5 - 5 0 0 0 号公報）。

6) カゼインを酸性プロテアーゼで分解し、中性でペプチダーゼで分解し、分子量 3, 0 0 0 ダルトン以下、遊離アミノ酸含量 3 0 ~ 5 5 %、 α_s -カゼインに対する E L I S A 抑制試験が α_s -カゼインの 1 0, 0 0 0 分の 1 以下、5 % 溶液の苦味官能値がカフェイン 0. 0 4 % 水溶液相当以下のペプチドが開示されている（特開平 6 - 1 1 3 8 9 3 号公報）。

7) ホエーを中性プロテアーゼ（アスペルギルス属）を用いて p H 5 ~ 1 1 で加水分解し、p H 2 ~ 4 で加熱し、沈殿を除去し、ジペプチド及びトリペプチドを 5 0 % の割合で得る方法が開示されている（特公平 5 - 8 2 4 1 2 号公報）。

また、動物性蛋白質（獣乳、卵、肉類、魚類等）又は植物性蛋白質（大豆、小麦等）を蛋白分解酵素で分解して得られるペプチド混合物には、増粘性、起泡性、抗酸化性、易消化吸収性、ミネラル可溶性、低抗原性等の性質、上皮細胞成長因子、細胞増殖因子、カルシウム吸収促進機能、オピオイド様活性等の生理活性機能が知られており（食品と開発、第 2 6 巻、第 1 1 号、第 2 8 ~ 3 6 ページ、1 9 9 1 年）、畜肉、水産練り製品、パン、菓子、ミネラル強化食品、乳幼児用食品、スポーツ飲料、一般栄養食品、経腸栄養剤、蛋白アレルギー対応食品、特殊栄養食品、医薬品等の製造に不可欠な原料の一つとなっている。

従来、これらの食品又は医薬品の製造に使用されるペプチド混合物の製造方法としては、用途に応じてそれぞれ異なるが、

a) 遊離のアミノ酸の生成をできるだけ制限するために原料蛋白質をエンドペプチダーゼのみで分解して目的のペプチド混合物を製造する方法

b) 原料蛋白質をエンドペプチダーゼとエキソペプチダーゼの組み合わせで分解し、逆に所定量の遊離アミノ酸を含有させたペプチド混合物を製造する方法、及び、

c) これらペプチド混合物からウルトラフィльтраーション (UF)、リバースオスモシス (RO)、ゲル濾過、イオン交換樹脂法等の分離操作により更に目的とするペプチド混合物を精製、分取する方法、

5 等に大別することができる。

また、フェニルケトン尿症 (以下 PKU と記載することがある) は、アミノ酸の一つであるフェニルアラニン (以下 Phe と記載することがある) をチロシンに変換するフェニルアラニン水酸化酵素が先天的に欠如しているため、Phe が、血中に蓄積され、神経系
10 の障害、発育障害を惹起する先天性代謝異常症である。従って、PKU 患者は、体内に Phe が蓄積しないよう医師の指導のもとに、Phe の摂取量を厳密に制御しなければならないのである。

一方、Phe は、蛋白質に通常 3 ~ 5 % 程度含まれている普通のアミノ酸であるため、従来、PKU 患者は、食品若しくは乳児用調製乳の蛋白質成分の一部又は全部を、Phe を含まないアミノ酸混合物に置換して摂取しなければならなかった。しかしながら、この
15 ようなアミノ酸混合物は、アミノ酸特有の不快感を呈するとともに、腸管での浸透圧が高いために下痢を惹起する等の欠点があった。そのため、風味が良く、かつ食事療法に好適な PKU 患者用蛋白質源が、患者、その家族又は医師から待望されていた。

その一つの方法として、PKU 患者用蛋白質源として κ -カゼイングリコマクロペプチド (以下 GMP と記載することがある) を用いる方法が開示されている (特開平 4 - 1 2 6 0 5 1 号公報)。GMP は、そのアミノ酸配列中に Phe を全く含まず、また分子量が
25 8, 0 0 0 ダルトンと大きく浸透圧上昇の問題もほとんどないため PKU 患者用蛋白質源として有効である。しかしながら、GMP を単離するための操作が極めて繁雑であり、工業的生産のためには不都合であった。しかも、最近の栄養学的知見によれば、蛋白質よりもオリゴペプチドの方が消化吸収に優れていることが明らかになって

いる。

P K U 患者用蛋白質源にオリゴペプチドを用いた他の例として、
蛋白質を蛋白分解酵素で分解し、P h e 含量の少ない画分をゲル濾
過により回収し、低フェニルアラニンペプチド（以下 L P P と記載
5 することがある）を用いる方法がある〔ジャーナル・オブ・フード
・サイエンス(Journal of Food Science)、第 4 1 巻、第 1 0 2 9
～ 1 0 3 2 ページ、1 9 7 6 年及び特開昭 6 1 - 6 8 4 2 6 号公報
〕。

更に、蛋白質を水系下で、エキソペプチダーゼで処理するか、又
10 はエンドペプチダーゼで処理後エキソペプチダーゼで処理し、芳香
族アミノ酸をほとんど含まないポリペプチドと遊離芳香族アミノ酸
又は芳香族アミノ酸を末端に有する低分子ペプチドを活性炭を用い
て吸着し、逆浸透膜又はイオン交換性電気透析膜を用いて低分子物
質を分離し、L P P を製造する方法が開示されている（特公平 2 -
15 5 4 0 7 0 号公報）。これらの方法により、L P P を工業的に製造
することが可能となった。

一方、蛋白分解酵素で原料の蛋白質を分解してペプチドを製造す
る場合、いくつかの従来技術を例示すれば次のとおりである。

1) 蛋白質をエンド型プロテアーゼ及びエキソ型プロテアーゼ共存
20 水系下に、0 . 5 ～ 1 0 時間酵素分解し、苦味の極めて少ない平
均鎖長 3 ～ 1 0 のオリゴペプチドを得ることを特徴とするオリゴ
ペプチド混合物の製造法が開示されている（特開昭 6 2 - 1 4 3
6 9 7 号公報）。

2) 任意の起源のタンパク質原料を水に 5 ～ 2 0 % (w/v) となるよ
25 うに分散させ、酸によって p H を 1 ～ 4 に調整し、2 種以上の酸
性プロテアーゼを同時に又は逐次的に添加して 2 5 ～ 6 0 °C の温
度で 8 ～ 7 2 時間遊離のアミノ酸の生成をおさえつつ酵素分解反
応を行い低分子ペプチド組成物を製造する方法が開示されている
（特公昭 5 7 - 4 5 5 6 0 号公報）。

- 3) カゼイン溶液をカラムに詰めた固定化酵素で部分分解する方法において、カゼイン溶液の通液速度を制御してカゼインの部分分解物を製造する方法が開示されている（特公平3-31421号公報）。
- 5 4) 溶解水等に蛋白質又は蛋白質を含有する物質と溶解促進剤を混合溶解した後、単数もしくは複数の蛋白質分解酵素を添加し消化反応せしめて蛋白分解物を製造するに際し、少なくとも前期蛋白分解物を添加した後の溶液の粘度を経時的に計測し、該粘度が大きく上昇して下降するその下降前に消化反応を停止することを特徴とする不溶解物の生成を防止した蛋白質分解物の製造方法が開示されている（特公平3-58252号公報）。
- 10 5) 獣乳κ-カゼイン由来のグリコポリペプチドのプロテアーゼ加水分解物であって、フィッシャー値が30から60の範囲であるペプチド混合物を製造する方法において、分解率が5～25%となった時点で加熱処理して酵素を失活させる方法が開示されている（特開平2-300137号公報）。
- 15 6) 乳蛋白質を固定化プロテアーゼで分解して蛋白分解物を製造する方法において、ペプチドセンサーでペプチド濃度を測定する方法及びペプチドの平均鎖長を測定する方法が開示されている（食品産業バイオリアクターシステム技術研究組合編、「実践バイオリアクター」、第166～184ページ、食品産業バイオリアクターシステム技術研究組合発行、1990年）。
- 20 7) 小麦グルテンを固定化プロテアーゼで分解してグルテン分解物を製造する方法において、グルテン分解物の疎水性を逆相高速液体クロマトグラフィー（以下高速液体クロマトグラフィーをHPLCと記載する）で経時的に計測して泡末安定性に優れたグルテン分解物が製造できることが開示されている（食品産業バイオリアクターシステム技術研究組合編、「実践バイオリアクター」、第106～126ページ、食品産業バイオリアクターシステム
- 25

技術研究組合発行、1990年）。

- 8) 味噌、醤油等の発酵食品の製造、リジン、グルタミン酸等のアミノ酸発酵における工程管理において目的生産物である遊離アミノ酸量を測定することが知られている（食品工業、第34巻、第16号、第1～11ページ、1991年）。
- 9) 原料蛋白質の抗原性を認めなくなるまで、かつ、原料蛋白質に含まれる芳香族アミノ酸が、90%以上遊離アミノ酸になるまで分解し、ゲル濾過法によりペプチド部分を回収することにより、抗原性を呈さず、分子量1,000ダルトン以下、遊離アミノ酸含有量が20%以下、芳香族アミノ酸含有量が全アミノ酸の1.0%以下の低分子量ペプチドの製造法が開示されている（特開平2-138991号公報）。
- 10) 牛乳ホエー蛋白質を、生体内で生ずる蛋白質消化をシミュレーションし得る蛋白質分解酵素と接触させることにより、加水分解を、生成物中に残留蛋白質がほとんど含有しなくなるまで、即ち、12%トリクロル酢酸に沈殿しうる窒素を含有しなくなるまで、及び少なくとも50%のペプチドが2～5のアミノ酸を含有し、遊離アミノ酸の量が15%以下であるペプチド混合物を得るまで継続することを特徴とする牛乳ホエー蛋白質からのペプチド混合物の製造法が開示されている（特公昭62-61039号公報）。
- 11) 乳蛋白質の加水分解物が、分子量1,000以下であり、芳香族アミノ酸の90%以上が遊離アミノ酸であって、ヒト皮膚細胞に対して増殖賦活作用を有し乳蛋白質の抗原性を有しないことを特徴とする化粧品及び皮膚外用剤が開示されている（特開平4-26604号公報）。

しかしながら、前記従来技術においては、乳清蛋白加水分解物の抗原性の低下、苦味の改善、遊離アミノ酸含量、分子量分布等については、考慮されているが、乳清蛋白加水分解物のアンモニア含有

量及び抗酸化作用については何等考慮されていない。そのため、従来、乳清蛋白加水分解物を広範な食品に使用できないという不都合があった。

また、上記従来技術に示されるように、従来、蛋白分解酵素で原料の蛋白質を分解してペプチド混合物を製造する場合、分解反応の終点を、反応時間、蛋白溶液の通液速度等を指標とし、分解物の粘度、分解率、疎水度等を測定することにより決定していたが、これらの方法では、刻々変化する分解物の理化学的性状、特に遊離のアミノ酸量を正確に把握することが極めて困難であり、従来のペプチド混合物の製造法においては、製造バッチごとにペプチド混合物が含有する遊離アミノ酸量及び組成が異なり、ペプチド混合物の品質が一定しないという致命的な欠点がありその改善が強く要請されている状況にあった。

しかも、酵素反応を再現性よく実施するためには、反応温度、pH、酵素力価、基質濃度等を厳密に制御しなければならず、そのため工業的スケールでは作業性も劣り、一定のアミノ酸遊離率を得ることは事実上困難であった。

このことは、高品質のL P Pを製造する場合においても次のような致命的な欠点を有することを意味している。前記のとおり、蛋白質を蛋白分解酵素で分解する工程を含むL P Pの製造法において、ペプチド混合物のP h e含量を低下させるための方法は、蛋白分解酵素により蛋白質を加水分解することにより蛋白質から十分量のP h eを遊離させ、遊離したP h eをゲル濾過、活性炭吸着等により除去するという原理に基づいており、蛋白質の蛋白分解酵素による加水分解工程の制御が高品質のL P Pを製造するための重要な技術となっている。

即ち、P h eの遊離が不十分であった場合には、酵素分解反応に続くゲル濾過又は活性炭処理により除去されるP h e量が少なくなるため、ペプチド混合物のP h e含量が高くなり、これはP K U患

者用として不適当なものとなる。また、P h e の遊離が過剰の場合
（換言すれば酵素分解反応が過度に進行した場合）、P h e 以外の
アミノ酸遊離率も高くなるために風味が著しく悪化し、浸透圧も高
くなるため、不快な味、下痢症状の発生等のため治療効果が極めて
5 低下する不都合があり、その改善が強く要請されている状況にあっ
た。即ち、高品質のL P P を製造するためには、蛋白質の蛋白分解
酵素による加水分解工程において得られるペプチド混合物の遊離P
h e 量が、常に一定となることが極めて重要な課題である。

10

発明の開示

本発明者らは、前記の従来技術に鑑みて鋭意研究を行い、乳清蛋
白質を加水分解することによって得られ、食餌アレルギーの回避、
予防及び治療に有効であり、消化吸収に優れ、アンモニア含有量が
15 低く、かつ抗酸化作用を有し、広範囲な用途に利用できる風味良好
な乳清蛋白加水分解物及びその製造法を見い出し、本発明を完成し
た。

また、このような状況の中で、本発明者らは、前記従来技術に鑑
みて、常に安定した状態で、一定の品質でペプチド混合物を製造す
る方法について鋭意研究を行った結果、加水分解物により分解液中
20 に遊離する特定のアミノ酸の量を、経時的に、かつ短時間で測定し
、原料蛋白質に含まれている該特定アミノ酸の量との割合を算出し
、その値が、特定の範囲内に達したときに直ちに加水分解を停止す
ることにより、所望のペプチド混合物が得られることを見い出し、
25 本発明を完成した。

更に、このような状況の中で、本発明者らは、前記従来技術に鑑
みて、常に安定した状態で、一定の品質のP h e 含量の少ないペプ
チド混合物を得るために、鋭意研究を行なった結果、蛋白質の蛋白
分解酵素による加水分解工程において、分解液中に遊離したP h e

の量を、経時的、かつ短時間で測定し、原料蛋白質に含まれている P h e の総量との割合を算出し、その値が予め設定した特定の範囲内に達したときに直ちに分解反応を停止し、遊離した P h e を除去することにより、簡便に、P h e 含量の少ないペプチド混合物が得られることを見い出し、本発明を完成した。

本発明の目的は、腸管吸収及びアミノ酸バランスに優れ、食餌アレルギーの予防及び治療効果並びに抗酸化作用を有し、アンモニア含有量が低く、広範囲な用途に利用できる風味良好な乳清蛋白加水分解物及びその製造法を提供することである。

また、本発明の目的は、遊離アミノ酸の量及び組成が一定し、品質が良好であるペプチド混合物を容易に製造し得る新規な方法を提供することにある。

更に、本発明の目的は、特に P K U 患者が日常的に摂取することが可能である、品質が良好なフェニルアラニン含量の少ないペプチド混合物を簡便に製造し得る新規な方法を提供することにある。

前記課題を解決する本発明の第 1 の発明は、純度が少なくとも 70 % (重量) の乳清蛋白質の加水分解物であって、次の a) ~ h) の理化学的性質；

- a) 分子量 5,000 ~ 10,000 ダルトンの画分が、全加水分解物の 1 % (重量) 未満であること、
- b) 抗乳清蛋白質血清を用いたエライザ抑制試験法により測定した抗原残存活性が 10^{-5} 以下であること、
- c) 加水分解物の全アミノ酸の量に対する遊離アミノ酸の量の割合が 10 ~ 15 % (重量) であること、
- d) 乳清蛋白質に含まれる全リジンの量に対する遊離リジンの量の割合が 12 ~ 20 % (重量) であること、
- e) アンモニア含量が 0.2 % (重量) 以下であること、
- f) 10 % (重量) 溶液を 1 cm のセル、540 nm で測定した透過率が 98 % 以上であること、

g) pH 4～7の5%（重量）溶液を120℃で10分間加熱して沈殿を生じないこと、及び

h) 抗酸化作用を有すること、

を有することを特徴とする風味良好な乳清蛋白加水分解物である。

- 5 前記課題を解決する本発明の第2の発明は、純度が少なくとも70%（重量）の乳清蛋白質を15%（重量）以下の濃度で水に溶解し、該水溶液のpHを7.5～10に調整し、該水溶液にバチルス・サチリス(Bacillus subtilis)由来のエンドペプチダーゼ及び乳酸菌由来のエキソペプチダーゼの2種類の蛋白分解酵素を添加して
- 10 加水分解を開始し、分解液中の遊離リジン量を経時的に測定し、出発原料である乳清蛋白質に含まれる全リジンの量に対する遊離リジンの量の割合が12～20%（重量）の範囲で加水分解を停止し、限外濾過して分子量10,000ダルトン以上の画分を完全に除去することを特徴とする風味良好な乳清蛋白加水分解物の製造法である。
- 15

- 前記課題を解決する本発明の第3の発明は、一定品質のペプチド混合物の製造法であって、1種若しくは2種以上の蛋白質からなる原料蛋白質の水溶液又は予め軽度に加水分解した原料蛋白質の水溶液に、1種若しくは2種以上の蛋白分解酵素を添加し、原料蛋白質
- 20 又は予め軽度に加水分解した原料蛋白質の加水分解を開始し、加水分解により分解液中に遊離した特定アミノ酸の量を経時的に、かつ短時間で測定し、原料蛋白質又は予め軽度に加水分解した原料蛋白質に含まれる特定アミノ酸の総量に対する遊離した特定アミノ酸の量の割合を算出し、その算出した値が予め設定された特定の範囲内
- 25 に達したとき直ちに加水分解を停止することを特徴とするペプチド混合物の製造法であり、特定アミノ酸が、リジン、フェニルアラニン、ロイシン又はアルギニンであることを望ましい態様としてもいる。

前記課題を解決する本発明の第4の発明は、フェニルアラニン含

量の少ない一定品質のペプチド混合物の製造法であって、1種若しくは2種以上の蛋白質からなる原料蛋白質の水溶液又は予め軽度に加水分解した原料蛋白質の水溶液に、1種又は2種以上の蛋白分解酵素を添加し、原料蛋白質又は予め軽度に加水分解した原料蛋白質の加水分解を開始し、加水分解により分解液中に遊離したフェニルアラニンの量を経時的に、かつ短時間で測定し、原料蛋白質又は予め軽度に加水分解した原料蛋白質に含まれるフェニルアラニンの総量に対する遊離したフェニルアラニンの量の割合を算出し、その算出した値が予め設定された特定の範囲内に達したときに直ちに加水分解を停止し、分解液中の遊離したフェニルアラニンを除去することを特徴とするフェニルアラニン含量の少ないペプチド混合物の製造法であり、遊離したフェニルアラニンの量の測定が、酵素膜センサーを用いて行われることを望ましい態様としてもいる。

次に本発明について詳述するが、本発明の理解を容易にするために、本発明の第2の発明から説明する。

本発明の方法の出発原料として使用する乳清蛋白質は、少なくとも70%の純度を有する市販品等が使用可能であり、乳清蛋白濃縮物(WPC)、乳清蛋白分離物(WPI)として知られているより純度の高い市販品等が好適である。これらの乳清蛋白質を15%以下、望ましくは8~12%、の濃度で水に溶解し、アルカリ水溶液でpHを7.5~10、望ましくは8~9、に調整する。

次いで、前記乳清蛋白溶液にバシラス・サチリス(*Bacillus subtilis*)由来のエンドペプチダーゼ及び乳酸菌由来のエキソペプチダーゼの2種類の蛋白分解酵素を添加する。その他、トリプシン、パepsin等のエンドペプチダーゼを極少量添加することもできる。ただし、乳酸菌由来以外のエキソペプチダーゼ(パンクレアチン等を含む)の添加は、風味を悪化させるので避けるべきである。

バシラス・サチリス(*Bacillus subtilis*)由来のエンドペプチダーゼは、市販品等が使用可能であり、乳清蛋白質1g当たり1,0

0 0 ~ 7, 5 0 0 P U N 単位 (この単位については後記する)、望ましくは 2, 0 0 0 ~ 3, 0 0 0 P U N 単位、の割合で添加する。

5 P U N 単位は、カゼイン [ハマーシュタイン (Hammerstein)。メルク社製] にバシラス・サチリス (*Bacillus subtilis*) 由来のエンドペプチダーゼを作用させ、3 0 °C で 1 分間に 1 μ g のチロシンに相当するアシルアミノ酸のフォリン試薬での呈色反応を示す酵素活性を 1 P U N 単位とする。

10 乳酸菌由来のエキソペプチダーゼは、例えば特公昭 5 4 - 3 6 2 3 5 号公報第 6 欄 4 行「(3) 使用する酵素について」の項に記載の方法により次のとおり製造することができる。

15 乳酸菌 (ビフィズス菌を含む) を公知の方法 (例えば特公昭 4 8 - 4 3 8 7 8 号公報記載の方法) により培養し、得られた培養液を遠心分離して乳酸菌菌体を回収し、滅菌水に菌体を懸濁し、遠心分離して乳酸菌菌体を回収する操作を 2 回反復し、菌体を洗浄し、2 0 % の濃度で菌体を滅菌水に懸濁し、菌体破砕機 [例えば、ダイノミル (Willy Bachnfen Engineering Works) 社製。K D L 型] により菌体を破砕し、凍結乾燥し、乳酸菌由来のエキソペプチダーゼ粉末を得る。

20 この酵素を乳清蛋白質 1 g 当たり 2 0 ~ 2 0 0 活性単位 (この単位については後記する)、望ましくは 6 0 ~ 9 0 活性単位、の割合で添加する。

25 活性単位は、次の方法により測定する。エキソペプチダーゼを含有する粉末を 0. 2 g / 1 0 0 m l の割合で 0. 1 モルのリン酸緩衝液 (p H 7. 0) に分散又は溶解して酵素溶液を調製する。一方、ロイシルパラニトロアニリド (国産化学社製。以後 L e u - p N A と記載する) を 0. 1 モルのリン酸緩衝液 (p H 7. 0) に溶解して 2 m M の基質溶液を調製する。酵素溶液 1 m l に基質溶液 1 m l を添加し、3 7 °C で 5 分間反応させ、のち 3 0 % の酢酸溶液 2 m l を添加して反応を停止させる。反応液をメンブランフィルターで

濾過し、波長 410 nm で濾液の吸光度を測定する。エキソペプチダーゼの活性単位は、1 分間に 1 μ mol の Leu-pNA を分解するのに必要な酵素量を 1 活性単位と定義し、次式により求めた。

$$\text{活性単位 (粉末 1 g 当たり)} = 20 \times (A/B)$$

- 5 ただし、前記の式において A 及び B は、それぞれ波長 410 nm における試料の吸光度及び 0.25 mM パラニトロアニリンの吸光度を示す。

- 10 酵素を添加した溶液を 30 ~ 60 °C、望ましくは 45 ~ 55 °C に保持して乳清蛋白質の加水分解を開始する。なお、加水分解反応が進行して pH が低下する場合には、その pH を 6 以上、好ましくは 6 ~ 7 に保持することが望ましい。

- 15 加水分解を開始後、経時的に分解液中の遊離リジン量を測定し得る装置、例えば、バイオテックアナライザー（旭化成工業社製）等、を用いて経時的に分解液中の遊離リジン量を測定し、出発原料である乳清蛋白質に含まれる全リジンの量に対する遊離リジンの量の割合が 12 ~ 20 %、望ましくは 14 ~ 17 %、の範囲に達したとき、直ちに反応液を加熱（例えば、85 °C で 15 分間等）して酵素を失活させ、加水分解を停止する。

- 20 得られた反応液をクエン酸等の酸により pH を 5.5 ~ 7 の範囲に調整し、公知の装置〔例えば、限外濾過モジュール（旭化成工業社製）等〕により限外濾過し、分子量 10,000 ダルトン以上の画分を完全に除去し、目的とする風味良好な乳清蛋白加水分解物を得る。この乳清蛋白加水分解物を含有する液を、公知の方法により濃縮し、濃縮液とすることもでき、更にこの濃縮液を公知の方法により乾燥し、粉末とすることもできる。

- 25 以上のようにして得られた乳清蛋白加水分解物は、後記する実施例からも明らかなように次の理化学的性状を有している。

a) 図 1 に示すとおり、分子量 5,000 ~ 10,000 ダルトンの画分が、全加水分解物の 1 %（重量）未満であり、分子量 10

、 0 0 0 ダルトン以上の画分を含まず、分子量 1, 0 0 0 ダルトン未満の画分が 7 0 % 以上であり、分子量 5 0 0 ダルトン及び分子量 1, 0 0 0 ダルトンにピークを有し、数平均分子量 3 0 0 ~ 4 0 0 ダルトン、重量平均分子量 6 0 0 ~ 8 0 0 ダルトンである

5

。

図 1 は、実施例 1 により得られた本発明の乳清蛋白加水分解物の分子量分布を示し、縦軸及び横軸は、それぞれ分布割合及び分子量を示す。

10

b) 図 2 に示すとおり、抗乳清蛋白質血清を用いたエライザ抑制試験法により測定した抗原残存活性が 10^{-5} 以下、望ましくは 10^{-6} 以下である。

15

図 2 は、実施例 1 により得られた本発明の乳清蛋白加水分解物の抗原残存活性を示し、縦軸及び横軸は、それぞれ抑制割合及び最終試料濃度を示す。図中 + 及び □ は、それぞれ本発明の乳清蛋白分解物及び乳清蛋白質を示す。

c) 加水分解物の全アミノ酸の量に対する遊離アミノ酸の量の割合が 1 0 ~ 1 5 % (重量)、望ましくは 1 1 ~ 1 3 % (重量) である。

20

d) 乳清蛋白質に含まれる全リジンの量に対する遊離リジンの量の割合が 1 2 ~ 2 0 % (重量)、望ましくは 1 4 ~ 1 7 % (重量) である。

e) アンモニア含量が 0. 2 % (重量) 以下、望ましくは 0. 1 % (重量) 以下である。

25

f) 1 0 % 溶液を 1 c m のセル、5 4 0 n m で測定した透過率が 9 8 % 以上である。

g) p H 4 ~ 7 の 5 % (重量) 溶液を 1 2 0 °C で 1 0 分間加熱して沈殿を生じない。

h) 図 3 に示すとおり、公知の抗酸化剤である α -トコフェロールと同等又はそれ以上の抗酸化活性を有する。図 3 は、実施例 1 に

より得られた本発明の乳清蛋白加水分解物の抗酸化活性を示し、縦軸及び横軸は、それぞれ抗酸化能残存率及び時間を示す。図中◇、+及び□は、それぞれ本発明の乳清蛋白分解物、 α -トコフェロール及び対照（試料又は標品無添加）を示す。

5 次に本発明の第3の発明について詳述する。

本発明の方法の出発原料として使用する原料蛋白質は、動物性蛋白質（例えば、獣乳由来、卵由来、魚肉由来、畜肉由来等）、植物性蛋白質（穀類由来、海草由来、種子由来等）又はこれらの任意の混合物であり、特に限定されるものではない。また、蛋白質を予め軽度に加水分解した分解物であって、更に蛋白分解酵素により分解し得る大きい分子量のペプチド混合物を出発原料とすることもできる。

原料蛋白質又は予め軽度に加水分解した原料蛋白質を、蛋白質換算で10%前後の濃度で水に溶解し、溶解液のpHをアルカリ溶液又は酸溶液を用いて、使用する蛋白分解酵素の至適pH付近に調整し、原料水溶液を調製する。

次いで、前記原料水溶液に動物由来（例えば、パンクレアチン、ペプシン、トリプシン等）、植物由来（例えば、パパイン、ブロメライン等）、微生物由来（例えば、かび、放線菌、細菌、乳酸菌等）の蛋白分解酵素又はこれらの任意の組合わせの蛋白分解酵素を目的に応じ適宜選択し、所定量を添加する。例えば、エンドペプチダーゼを原料蛋白質1g当たり2000～5000PUN単位、エキソペプチダーゼを原料蛋白質1g当たり20～100活性単位の添加を、望ましい態様として例示することができる。

25 所定量の酵素を添加した原料水溶液は、通常は酵素の至適温度に所定時間保持して蛋白質の酵素による加水分解を行い、分解中に微生物の増殖が懸念される場合は、必要に応じて酵素の至適温度より高温域又は低温域の温度に所定時間保持して蛋白質の酵素による加水分解を行うこともできる。

加水分解を開始し、分解液中に遊離した特定アミノ酸の量を経時的に、かつ短時間で測定する。具体的には、例えば、HPLC、バイオテックアナライザー（旭化成工業社製）、パフュージョン・クロマトグラフィー（パーセプティブ・バイオシステム社製。BioCAD）等を用いることができる。使用する原料蛋白質及び酵素の種類により遊離するアミノ酸の量が異なるので、大量に遊離するアミノ酸を特定アミノ酸として選択するのが望ましい。特に望ましい態様として、分解液中に遊離した特定アミノ酸の量をオンラインにより、測定することを例示できる。また、特定アミノ酸としては、リジン、フェニルアラニン、ロイシン、アルギニン等が特に好適なものとして例示される。これらにより、分解液中に遊離した特定アミノ酸の量を経時的に、かつ短時間で測定し、出発原料である蛋白質に含まれる特定アミノ酸の総量に対する遊離した特定アミノ酸量の割合が予め設定された特定の範囲に達した時、直ちに反応液中の酵素を失活又は除去し、加水分解を停止する。前記特定の範囲は、目的とするペプチド混合物、使用する原料、使用する酵素等により異なるが、例えば、遊離したリジンの量を経時的、かつ短時間で測定しながら、乳清蛋白質を加水分解する場合、遊離リジンの量の範囲として5～40%を例示することができる。

本発明において、反応液中の酵素を失活又は除去して加水分解を停止する方法は、特に限定されるものではなく、適宜の方法が使用されるが、該加水分解を停止するまでに、時間的ずれを伴う場合もあり（例えば、ある量の分解液を加熱し、酵素を失活させるまで、30～60分を要する場合もある）、この場合加水分解が進行するおそれがあるので、予め予備試験を行い、所定の条件のもとに、分解の進行程度（例えば、特定の遊離アミノ酸の生成速度）を測定し、酵素の失活又は除去に要する時間を考慮し、前記特定の範囲を決定し、設定することが望ましい。

分解を終了したペプチド混合物を含有する分解液を、公知の方法

により濃縮し、濃縮液とすることもでき、また、この濃縮液を公知の方法により乾燥し、粉末とすることもできる。更に、ペプチド混合物を含有する液を、限外濾過、ゲル濾過等公知の方法により精製し、公知の方法により濃縮し、濃縮液とすることもでき、また、この濃縮液を公知の方法により乾燥し、粉末とすることもできる。

また、加水分解を行う反応容器の形状（例えば、タンク式、チューブ式、カラム式等）、分解処理方式（例えば、回分式、連続式、逐次式等）、酵素の失活、分離又は除去方法、ペプチドの精製方法等は、公知の方法及び装置を使用することが可能であり、特に限定されるものではない。

以上のようにして、遊離アミノ酸の量及び組成が常に一定であり、かつ品質が変動しないペプチド混合物を製造し得る。

次に本発明の第4の発明について詳述する。

本発明の出発原料として使用する原料蛋白質は、獣乳、卵、魚肉、畜肉等に由来する動物性蛋白質、大豆、小麦等に由来する植物性蛋白質、又はこれらの任意の混合物であり、特に限定されるものではない。また、蛋白質を予め軽度に加水分解した分解物であって、更に蛋白分解酵素により分解し得る大きい分子量のペプチド混合物を出発原料とすることもできる。

原料蛋白質又は予め軽度に加水分解した原料蛋白質を、蛋白質換算で10%前後の濃度で水に溶解し、殺菌及び蛋白質の酵素分解を効率よく行うため、65～90℃の温度範囲で5～30分間加熱処理してもよい。次いで溶液のpHをアルカリ又は酸溶液を用いて使用する蛋白分解酵素の至適pH付近に調整し、原料水溶液を調製する。

次いで、前記原料水溶液に蛋白分解酵素を添加するが、蛋白分解酵素の添加は一括添加、又は少量に分割して添加する逐次添加であってもよい。使用する蛋白分解酵素としては、動物由来（例えば、パンクレアチン、ペプシン、トリプシン、キモトリプシン等）、植

物由来（例えば、パパイン、ブロメライン等）、微生物由来（例えば、酵母、カビ、細菌、放線菌、乳酸菌等）のエンドプロテアーゼ及びエキソプロテアーゼがあげられるが、エンドプロテアーゼとしては、P h e等の芳香族アミノ酸に対して親和性のあるものが好ましく、例えば、ペプシン、キモトリプシン等が望ましい。エキソプロテアーゼとしては、P h e等の芳香族アミノ酸を末端に有するペプチドに対してペプチダーゼ活性を示すものが好ましく、黒麹菌、放線菌、酵母等に由来するエキソペプチダーゼを好適な例として示すことができる。

10 P h eを十分に遊離させるためには、前記のエンドプロテアーゼとエキソプロテアーゼとを組み合わせる用いることが望ましく、原料蛋白質溶液に一括添加により、又はエンドプロテアーゼを添加した後一定時間経過後にエキソプロテアーゼを添加し、段階的に、分解反応を実施することもできる。添加する酵素量は、例えば、エン
15 ドペプチダーゼを原料蛋白質1 g当たり5 0 0 0～1 0 0 0 0 P U N単位、エキソペプチダーゼを原料蛋白質1 g当たり1 0～5 0 活性単位の添加を、望ましい態様として例示することができる。

所定量の酵素を添加した原料水溶液を、通常、酵素の至適温度に所定時間保持して蛋白質の酵素による分解を開始するが、分解中に微生物の増殖が懸念される場合は、必要に応じて酵素の至適温度より高温域または低温域の温度に所定時間保持して蛋白質の酵素による加水分解を行なうこともできる。しかしながら、酵素の至適温度よりも極端に異なる温度範囲では、加水分解反応の効率が低下するので、通常4 0～6 0℃の温度範囲が望ましい。

20 加水分解の開始後、分解液中に遊離したP h eの量を経時的に、かつ短時間に測定するが、例えば、H P L C、酵素膜センサー〔例えば、バイオテックアナライザー（旭化成工業社製）〕等を用いることができ、特に望ましい態様としてオンラインにより測定する方法を例示することができる。これらにより、分解液中に遊離したP

h e の量を経時的に、かつ短時間に測定し、出発原料である蛋白質又は予め軽度に加水分解した蛋白質に含まれる P h e の総量に対する遊離した P h e の量の割合が予め設定された特定の範囲に達したとき、ただちに分解液中の酵素を失活又は除去し、加水分解を停止する。該ペプチド混合物を P K U 患者に供することを考慮すると、原料蛋白質又は予め軽度に加水分解した蛋白質に含まれる P h e を高度に遊離して除去する必要があるので、前記特定の範囲は、85～95%を例示することができ、望ましくは88～92%である。

分解液中の酵素の失活又は除去は、常法による加熱処理、限外濾過膜等を用いる分解液からの酵素の除去等により実施することができる。加熱処理の加熱温度と保持時間は使用した酵素の熱安定性を考慮し、十分に失活できる条件を適宜設定することができる。加熱処理又は濾過処理による酵素の失活又は除去工程には、相当の時間を要し、この間に分解が進行するおそれがある場合には、所定の条件のもとに、分解の進行程度（P h e の遊離速度）を、試験により予め測定し、その結果に基づいて加水分解を停止する前記特定の範囲を決定し、設定するのが望ましい。

分解液中の酵素の失活又は除去後、常法により分解液を冷却し、セライト濾過、精密濾過、限外濾過、遠心分離等の方法により分解液から沈殿を除去する。得られた分解液からの P h e 等の芳香族アミノ酸の除去は、適宜の方法、例えば、ゲル濾過法、吸着樹脂法、活性炭吸着法等を単独又は組合わせて実施することができる。ゲル濾過剤としては、排除限界分子量10,000ダルトン以下、望ましくは2,500ダルトン以下のものを使用し、芳香族アミノ酸に吸着性をもつ疎水性側鎖、例えば、カルボキシ基、ブチル基、フェニル基、疎水性部位をもつゲル担体を、特に好適な例として示すことができる。このようなゲル濾過剤としては、セファデックスG-10（ファルマシア社製）、セルロファインGCL-25（生化学工業社製）等、また、活性炭としては、例えば、白鷺（武田薬品

工業社製)等を例示することができる。

5 ゲル濾過剤又は活性炭をカラムに充填し、このカラムに分解液を通液する。溶出液としては水又は芳香族アミノ酸の吸着性を高めるため2～15%のエタノール水溶液を溶出液として使用することができる。芳香族アミノ酸の除去操作は、分解液にゲル濾過剤又は活性炭を投入し、所定時間静置し、芳香族アミノ酸を吸着させるバッチ法式により実施することもできる。

10 前記の方法によって得られたフェニルアラニン含量の少ないペプチド混合物の溶液を、公知の方法により濃縮して濃縮液とすることもでき、また、この濃縮液を公知の方法により乾燥して粉末とすることもできる。得られたフェニルアラニン含量の少ないペプチド混合物の溶液、その濃縮液又はその粉末は、通常の商品原料と同様にPKU患者用の食品原料として使用し、各種PKU患者用の食品を製造することができる。

15

図面の簡単な説明

図1は、本発明の乳清蛋白加水分解物の分子量分布を示す。

図2は、本発明の乳清蛋白加水分解物の抗原残存活性を示す。

図3は、本発明の乳清蛋白加水分解物の抗酸化活性を示す。

20

次に、試験例を示して本発明を詳述する。本発明の試験例においては、次の試験方法を採用した。

(1) 分子量の測定方法

25 HPLC(宇井信生ら編、「タンパク質・ペプチドの高速液体クロマトグラフィー」、化学増刊第102号、第241ページ、化学同人、1984年)により次のようにして測定した。ポリハイドロキシエチル・アスパルアミド・カラム[ポリエルシー(PolyLC)社製。直径4.6mm及び長さ200mm]を用い、20mM塩化ナトリウム、50mMギ酸により溶出速度0.4ml/分で溶出した。

検出はUV検出器を用い、データ解析はGPC分析システム（島津製作所製）を使用した。

（２）抗原残存活性の測定方法

ELISA抑制試験法（日本小児アレルギー学会誌、第1巻、第36ページ、1978年）により次のようにして測定した。96穴プレート（マunk社製）に乳清蛋白質をコーティングし、洗浄し、ウサギ抗乳清蛋白質血清及び加水分解物試料の混合液をプレートの穴に供給して反応させ、洗浄後アルカリホスファターゼ標識ヤギ抗ウサギIgG抗体（ザイメッド・ラボラトリー社製）を反応させ、洗浄後p-ニトロフェニル・リン酸ナトリウムを添加し、30分後に5N水酸化ナトリウムを添加して反応を停止させ、反応生成物をマイクロプレートリーダー（和光純薬工業社製）で測定した。

なお、抑制用被検抗原液添加による反応抑制の程度の表現には次の式で算出した抑制率を用いた。

$$\text{抑制率（％）} = \left(1 - \frac{\text{被検抗原液での吸光度}}{\text{対照の吸光度}} \right) \times 100$$

ただし、被検抗原液の吸光度及び対照の吸光度は抗乳清蛋白質血清にそれぞれ等量の被検試料液又は希釈液の混合液を入れた穴の反応後測定した値である。

（３）アミノ酸組成の測定方法

トリプトファン、システイン及びメチオニン以外のアミノ酸については、試料を6N塩酸で110℃、24時間加水分解し、トリプトファンについては、水酸化バリウムで110℃、22時間アルカリ分解し、システイン及びメチオニンについては、過酸処理後6N塩酸で110℃、18時間加水分解し、それぞれアミノ酸分析機（日立製作所製。835型）により分析し、アミノ酸の質量を測定した。

（４）遊離アミノ酸組成の測定方法

スルホサリチル酸で試料を除蛋白し、アミノ酸分析機（日立製作

所製。835型)により分析し、遊離アミノ酸の質量を測定した。
そして、前記アミノ酸組成の分析で得られた各アミノ酸の質量に対する遊離アミノ酸質量の百分率を算出した。

(5) 遊離リジン含量の測定方法

- 5 リジン測定用酵素電極、20 mM L-リジン標準液、0.1 M 磷酸 L-リジン測定用緩衝液及び洗浄用界面活性剤(いずれも旭化成工業社製)を用い、バイオテックアナライザー(旭化成工業社製)により遊離リジン濃度をバッチ式又はオンラインで測定し、蛋白質のリジン含有量に対する分解溶液の遊離リジン含有量から全リジン
10 に対する遊離リジンの量の割合を算出した。

(6) アンモニア含量の測定方法

スルホサリチル酸で試料を除蛋白し、アミノ酸分析機(日立製作所製。835型)により分析し、アンモニアの質量を測定した。

(7) 抗酸化作用の測定方法

- 15 リノール酸、 β -カロチンを Tween 20 で乳化し、これに試料又は標品として α -トコフェロールを添加し、経時変化を比色法により測定した[フィトケミストリー(Phytochemistry)、第10巻、第1445ページ、1971年]。リノール酸、 β -カロチン、
Tween 20、試料及び α -トコフェロールの最終濃度は、それ
20 ぞれ 0.96 mg/ml、4.8 μ g/ml、9.6 mg/ml、0.19 mg/ml 及び 0.19 mg/ml であった。

(8) 遊離リジン含量の測定方法

- リジン測定用酵素電極、20 mM L-リジン標準液、0.1 M 磷酸 L-リジン測定用緩衝液及び洗浄用界面活性剤(いずれも旭化成工業社製)を用い、バイオテックアナライザー(旭化成工業社製)
25 により遊離リジン濃度を測定し、原料蛋白質のリジン含有量に対する分解溶液の遊離リジン含有量から全リジンに対する遊離リジンの量の割合を算出した。

(9) 遊離 Phe 量の測定方法

遊離アミノ酸濃度測定用酵素膜センサー（旭化成工業社製）を装着したバイオテックアナライザー（旭化成工業社製）により遊離アミノ酸量を測定し、この値と予め予備実験により求めた遊離Phe率との相関値から分解液中の遊離Phe量を測定した。

5 (10) HPLC

Inertsil PREP-ODS（GLサイエンス社製。6.5 × 250 mm）カラムをHPLC（島津製作所製）に装着し、分解液0.1 mlを供給し、溶離液A（0.1%トリフルオロ酢酸溶液）に対する溶離液B（0.1%トリフルオロ酢酸-アセトニトリル溶液）の割合が100分間で50%となる濃度勾配で1.5 ml/分の流速で溶出を行った。

(11) 分解率

ケルダール法により試料の全窒素を、ホルモール滴定法により試料のホルモール態窒素を、それぞれ測定し、これらの値から次式により算出した。

$$\text{分解率 (\%)} = (\text{ホルモール態窒素}) / (\text{全窒素}) \times 100$$

分解率 (%) は、原料蛋白質溶液の全窒素量当たりの分解溶液のホルモール態窒素量の百分率であり、具体的には、次の方法により求めた。蛋白分解溶液4 mlと蒸留水30 mlを混合し、0.2 N水酸化ナトリウム溶液又は塩酸溶液でpHを6.8に調整する。この溶液を0.2 N水酸化ナトリウム溶液でpHを8.0に調整したホルマリン溶液5 mlを添加し、0.1 N水酸化ナトリウム溶液でpHが7.9に達するまで滴定する。この時の滴定量をA ml、0.1 N水酸化ナトリウム溶液のファクターをF、原料蛋白質溶液の蛋白濃度をB (%) として、分解率を次式から算出した。

$$\text{分解率 (\%)} = 22.3 \times A \times F / B$$

試験例 1

この試験は、抗原性と密接に関連する高分子量画分の比率を指標

として、加水分解に供する乳清蛋白質溶液の好適な濃度を調べるために行った。

1) 試料の調製

表 1 に示すとおり乳清蛋白質濃度を変更したことを除き、実施例 1 と同一の方法により乳清蛋白質溶液を加水分解し、7 種類の試料を調製した。

2) 試験方法

分子量 5,000 ～ 10,000 ダルトンの画分の比率は前記分子量の測定方法により求めた。

3) 試験結果

この試験結果は、表 1 に示すとおりである。表 1 から明らかなように、分子量 5,000 ～ 10,000 ダルトンの画分が 1 % 未満となる乳清蛋白質の濃度は、15 % 以下、望ましくは 12 % 以下であることが判明した。反応効率を考慮するならば、8 ～ 12 % が最も望ましい。尚、乳清蛋白質の種類、バシラス・サチリス由来のエンドペプチダーゼ及び乳酸菌由来のエキソペプチダーゼの種類、及び後記する試験例 3 において求められた範囲内で、その酵素量を変更して試験したが、ほぼ同様の結果が得られた。

【 0 0 4 1 】

表 1

乳清蛋白質 濃度 (%)	分子量 5,000 ～ 10,000 ダルトンの画分 (%)
5	0.2
8	0.3
10	0.3
12	0.3
15	0.9
18	1.5
20	ゲル化

試験例 2

この試験は、抗原性を指標として、加水分解のために好適な酵素処理初発 pH 範囲を調べるために行った。

1) 試料の調製

- 5 加水分解の初発 pH を次のとおり変更したことを除き、実施例 1 と同一の方法により乳清蛋白質溶液を加水分解し、5 種類の試料を調製した。

試料 1 : 初発 pH を pH 6.5 に調整した後、加水分解を行った。

試料 2 : 初発 pH を pH 7.5 に調整した後、加水分解を行った。

- 10 試料 3 : 初発 pH を pH 8.0 に調整した後、加水分解を行った。

試料 4 : 初発 pH を pH 9.0 に調整した後、加水分解を行った。

試料 5 : 初発 pH を pH 10.0 に調整した後、加水分解を行った。

。

2) 試験方法

- 15 抗原残存活性は、前記抗原残存活性の測定方法により測定した。

3) 試験結果

- この試験結果は、表 2 に示すとおりである。表 2 から明らかなように、低い抗原性の乳清蛋白加水分解物を得るためには、加水分解のための初発 pH は 7.5 ~ 10.0、望ましくは 8 ~ 9 であることが判明した。尚、乳清蛋白質の種類、バシラス・サチリス由来のエンドペプチダーゼ及び乳酸菌由来のエキソペプチダーゼの種類、及び後記する試験例 3 において求められた範囲内で、その酵素量を変更して試験したが、ほぼ同様の結果が得られた。
- 20
- 25

表 2

試料番号	酵素処理初発pH	抗原残存活性
1	6.5	10^{-5}
2	7.5	10^{-6}
3	8.0	$< 10^{-6}$
4	9.0	$< 10^{-6}$
5	10.0	10^{-6}

10 試験例 3

この試験は、抗原性と密接に関連する高分子量画分の比率、アンモニア含量、及び抗酸化活性を指標として、酵素の適正な使用量を調べるために行った。

1) 試料の調製

15 表 3 に示すように酵素の使用量を変更したことを除き、実施例 1 と同一の方法により乳清蛋白質溶液を加水分解し、12 種類の試料を調製した。なお、試料番号 1 及び 7 は、30 時間加水分解を行っても遊離リジン量が、14% に到達しなかったため、その時点で加水分解を終了した。

20 2) 試験方法

分子量 5,000 ~ 10,000 ダルトンの画分の比率は前記分子量の測定方法、アンモニア含量は前記アンモニア含量の測定方法、及び抗酸化活性は前記抗酸化作用の測定方法により求めた。なお、試料の抗酸化活性は、 α -トコフェロールの抗酸化活性に対する相対的な強さを指標として表わした。

25 3) 試験結果

この試験結果は、表 3 に示すとおりである。表 3 から明らかなように、分子量 5,000 ~ 10,000 ダルトンの画分が 1% 以下、アンモニア含量が 0.2% 以下、かつ α -トコフェロールと同等

又はそれ以上の抗酸化活性となる酵素の使用量は、乳清蛋白質 1 g あたりバシラス・サチリス由来のエンドペプチダーゼが 1, 0 0 0 ~ 7, 5 0 0 P U N 単位、望ましくは 2, 0 0 0 ~ 3, 0 0 0 P U N 単位、乳酸菌由来のエキソペプチダーゼが 2 0 ~ 2 0 0 活性単位、望ましくは 6 0 ~ 9 0 活性単位の範囲であることが判明した。尚、乳清蛋白質の種類、及びバシラス・サチリス由来のエンドペプチダーゼ及び乳酸菌由来のエキソペプチダーゼの種類を変更して試験したが、ほぼ同様の結果が得られた。

表 3

試料 番号	酵素添加量 (基質 1 g 当たり)		分子量 5,000 ~ 10,000 ダルトンの画分 (%)	フェニル 含量 (%)	抗酸化活性
	酵素 1 (PUN単位)	酵素 2 (活性単位)			
1	0	90	6.4	0.03	+
2	1000	90	0.9	0.05	++
3	2000	90	0.3	0.09	++
4	3000	90	0.2	0.11	++
5	7500	90	0.3	0.10	++
6	10000	90	0.3	0.14	+
7	3000	0	1.4	0.03	++
8	3000	20	1.0	0.05	++
9	3000	60	0.3	0.05	++
10	3000	90	0.2	0.11	++
11	3000	200	0.2	0.18	++
12	3000	300	0.2	0.33	+

(注1) 酵素1及び酵素2は、それぞれプロテアーゼNアマノ (バシラス・サチリス由来のエンドペプチダーゼ) 及びラクトバシラス・ヘルベティカス菌体破砕物 (乳酸菌由来のエキソペプチダーゼ) を示す。

(注2) 抗酸化活性の符号の説明

+: α -トコフェロールの抗酸化活性以下であることを示す。

++: α -トコフェロールの抗酸化活性と同等又はそれ以上であることを示す。

試験例 4

この試験は、風味、抗原性と密接に関連する高分子量画分の比率、及び風味に影響を及ぼす遊離アミノ酸の含量を指標として、加水分解物の適正なリジンの遊離率を調べるために行った。

5 1) 試料の調製

表 4 に示すとおり、加水分解反応を、所望の遊離リジンの量の割合で、適宜、酵素を失活させて停止させたことを除き、実施例 1 と同一の方法により 7 種類の試料を調製した。

2) 試験方法

10 分子量 5,000 ~ 10,000 ダルトンの画分の比率及び遊離アミノ酸の含量は、いずれも前記の方法により求めた。なお、風味は下記の方法により試験した。

a) 風味試験

15 男女各 10 名のパネルにより官能的に試験し、風味良 (0 点) から風味不良 (3 点) までの 4 段階に評価し、評価点の平均値から、0.5 点未満を良、0.5 点以上 ~ 1.5 点未満をやや良、1.5 点以上 ~ 2.5 点未満をやや不良及び 2.5 点以上 ~ 3.0 点未満を不良と判定した。

20 3) 試験結果

この試験の結果は、表 4 に示すとおりである。表 4 から明らかなように風味が良い乳清蛋白質分解物は、リジンの遊離率が 12 ~ 20 %、望ましくは 14 ~ 17 % であることが判明した。尚、乳清蛋白質の種類、バシラス・サチリス由来のエンドペプチダーゼ及び乳酸菌由来のエキソペプチダーゼの種類、及び前記する試験例 3 において求められた範囲内で、その酵素量を変更して試験したが、ほぼ同様の結果が得られた。

表 4

遊離リジン量 (%)	風味	分子量 5,000～10,000 ダルトンの画分 (%)	遊離アミノ酸 (%)
0.1	不良	2.1	0.2
6	やや不良	1.5	5
12	やや良	0.4	10
14	良	0.3	11
17	良	0.2	13
20	やや良	0.2	15
27	やや不良	0.2	20

試験例 5

この試験は、抗原性と密接に関連する高分子量画分の比率、抗原性、食品素材として好適な性質である透明性の基準となる透過率及び熱安定性を指標として、加水分解物の好適な濾過方法を調べるために行った。

1) 試料の調製

表 5 に示すとおり濾過膜（分画分子量）を変更したことを除き、実施例 1 と同一の方法により乳清蛋白質溶液を加水分解し、3 種類の試料を調製した。なお、濾過膜として、旭化成工業社製の分画分子量 3,000 ダルトン及び 10,000 ダルトンの限外濾過膜、及び孔径 0.25 μm の精密濾過膜を使用した。

2) 試験方法

分子量 5,000～10,000 ダルトンの画分の比率、抗原残

存活性、透過率、及び熱安定性は、いずれも前記の方法により求めた。

3) 試験結果

この試験の結果は、表 5 に示すとおりである。表 5 から明らか
5 ように、分子量 5, 000 ~ 10, 000 ダルトンの画分が 1 % 未
満、透過率が 98 % 以上、耐熱性を有する限外濾過処理方法は、ク
エン酸で pH を 5.5 ~ 7 に調整し、分画分子量 10, 000 以下
、望ましくは 3, 000 以下、の限外濾過膜を用いることが必要で
10 あることが判明した。尚、乳清蛋白質の種類、バシラス・サチリス
由来のエンドペプチダーゼ及び乳酸菌由来のエキソペプチダーゼの
種類、及び前記する試験例 3 において求められた範囲内で、その酵
素量を変更して試験したが、ほぼ同様の結果が得られた。

表 5

分画分子量	pH	分子量 5,000 ~10,000ダルトン の画分 (%)	抗原残存 活 性	透過率 (%)	熱安定性	
					pH5.5~7	pH4
3000ダルトン	7.0	0.2	$< 10^{-5}$	99	-	-
10000ダルトン	5.5	0.3	$< 10^{-6}$	98	-	-
精密濾過膜 0.25 μ m	6.5	1.5	$10^{-4.5}$	96	+	+

(注)

20 - 及び + は、それぞれ沈殿生成なし、及び沈殿生成を示す。

試験例 6

この試験は、風味と抗酸化活性を指標として、加水分解のために
25 好適な酵素の種類を調べるために行った。

1) 試料の調製

表 6 に示すとおり使用する酵素の種類及び添加量を変更したこと
を除き、実施例 1 と同一の方法により 6 種類の試料を調製した。な
お、酵素としては、バシラス・サチリス由来のエンドペプチダーゼ

として、ビオブラーゼ 6.0 S（長瀬生化学工業社製）、乳酸菌由来のエキソペプチダーゼとして、後記する参考例 1 と同様の方法で調製したラクトバシラス・ヘルベティカス菌体破砕物又はビフィドバクテリウム・プレーベ菌体破砕物、その他のエンドペプチダーゼとして、トリプシン（ノボノルディスク社製）、及びその他のエキソペプチダーゼとして、デナチーム AP（長瀬産業社製）を用いた。また、試料番号 1 及び 2 は、30 時間加水分解を行っても遊離リジン量が、14%に達しなかったため、その時点で加水分解を終了した。

2) 試験方法

風味及び抗酸化活性は、いずれも前記の方法により求めた。

3) 試験結果

この試験の結果は、表 6 に示すとおりである。表 6 から明らかなように風味が良くかつ α -トコフェロールと同等又はそれ以上の抗酸化活性を有する乳清蛋白質分解物は、バシラス・サチリス由来のエンドペプチダーゼ及び乳酸菌由来のエキソペプチダーゼの 2 種類の蛋白分解酵素で加水分解したものであることが判明した。尚、乳清蛋白質の種類、酵素の種類及び量を変更（バシラス・サチリス由来のエンドペプチダーゼ及び乳酸菌由来のエキソペプチダーゼについては、前記する試験例 3 において求められた範囲内で、その酵素量を変更）して試験したが、ほぼ同様の結果が得られた。

表 6

試料 番号	使用酵素及び添加量 (基質 1 g あたり)	風味	抗酸化活性
1	ビオブラーゼ 3000 PUN 単位	不良	++
2	ラクトバシラス・ヘルベチカス 90 活性単位	不良	+
3	ビオブラーゼ 3000 PUN 単位 ビフィバクテリウム・ブレーベ 90 活性単位	良	++
4	ビオブラーゼ 3000 PUN 単位 ラクトバシラス・ヘルベチカス 90 活性単位	良	++
5	トリプシン 3000 PUN 単位 ラクトバシラス・ヘルベチカス 90 活性単位	やや不良	+
6	ビオブラーゼ 3000 PUN 単位 デナチウム AP 90 活性単位	やや不良	++

(注) 抗酸化活性の符号の説明

+ : α -トコフェロールの抗酸化活性以下であることを示す。++ : α -トコフェロールの抗酸化活性と同等又はそれ以上であることを示す。

参考例 1

コーンスティープリカー 20 部 (重量。以下同じ) に水道水 100 部及び石灰 5 部を添加し、コーンスティープリカーに含まれている酸を中和し、濾過助剤としてセライト 50 部を添加して濾過し、濾液 A を得た。これとは別に、フィッシュリバー 20 部、モラセス 35 部及び水道水 200 部の混合液にセライト 50 部を添加して濾過し、濾液 B を得た。

前記濾液 A 及び濾液 B の当量混合液 500 部にグルコース 5 部、リン酸一カリウム 2.5 部、リン酸二カリウム 2.5 部及び酢酸ナトリウム 5 部を添加し、30% 水酸化ナトリウムで pH を 6.4 に調整し、水を添加して 1000 部に調整した。

滅菌した前記組成の培地 10 リッターに乳酸菌ラクトバシラス・ヘルベティカスを培養し、得られた培養液を遠心分離して乳酸菌菌体を回収し、滅菌水に菌体を懸濁し、遠心分離して乳酸菌菌体を回収する操作を 2 回反復して菌体を洗浄し、のち 20 % の濃度で菌体を滅菌水に懸濁し、超音波破碎機（ブランソン社製。SONIFIER model 250）により菌体を破碎し、凍結乾燥し、乳酸菌由来のエキソペプチダーゼ粉末約 25 g を得た。

参考例 2

実施例 2 と同一の方法で得た乳清蛋白加水分解物（蛋白質等量 79.4 %）25.0 kg を水 140 kg に溶解し、5 kg の水に溶解した所定量のミネラル類を加え、60 °C に加熱し、DHA 70 g を含む植物性脂肪 2.0 kg、マルツデキストリン 65.1 kg、砂糖 6.6 kg 及び所定量のビタミン類を混合し、この混合液を高圧均質機で十分均質化し、120 °C で 2 秒間殺菌し、噴霧乾燥し、粉末状の抗アレルギー性組成物約 99 kg を得た。

試験例 7

この試験は、従来から採用されているペプチド混合物の製造方法、即ち、①反応時間を指標にして酵素分解を停止する方法及び②分解率を指標にして酵素分解を停止する方法と、③本発明の方法とにより、ペプチド混合物を製造し、得られたペプチド混合物の品質（遊離アミノ酸組成及び遊離アミノ酸量の変動）に及ぼす影響を比較検討した。

1) 試料の調製

前記①の方法では、酵素分解を 4 時間で停止したこと、前記②の方法では、酵素分解を分解率が 23 % に達した時に停止したこと、前記③の本発明の方法では、分解液中の遊離リジン濃度を経時的に、かつ短時間で測定し、リジンの遊離率が 15 % に達した時点で酵

素分解を停止したこと、を除き、実施例 8 と同一の方法により乳清蛋白質溶液の加水分解をそれぞれ 5 回反復して実施し、合計 15 種類の試料を調製した。

2) 試験方法

- 5 各試料の遊離アミノ酸量及び遊離アミノ酸組成を前記の方法により測定し、5 回の結果の平均値と標準偏差を算出した。

3) 試験結果

- この試験結果は表 7 に示すとおりである。表 7 から明らかなように、各方法で製造したペプチド混合物の各遊離アミノ酸量及び遊離
10 アミノ酸の合計量の平均値には多少の差はあったが、遊離した各アミノ酸の量の標準偏差及び遊離アミノ酸量の合計の標準偏差は、③
の本発明の方法が最も小さく、安定しており、次いで②の方法の変動が少なく、①の方法は最も変動が大きく製造上品質が不安定であることが認められた。

15

20

25

表 7

アミノ酸	①の方法 遊離アミノ酸量 (g/100g)		②の方法 遊離アミノ酸量 (g/100g)		③本発明の方法 遊離アミノ酸量 (g/100g)	
	平均値	標準偏差	平均値	標準偏差	平均値	標準偏差
5						
L-アスパラギン酸	0.15	0.042	0.16	0.031	0.16	0.021
L-スレオニン	0.50	0.061	0.55	0.044	0.54	0.030
L-セリン	0.57	0.060	0.59	0.044	0.57	0.029
L-グルタミン酸	0.36	0.043	0.32	0.032	0.32	0.021
L-グリシン	0.18	0.042	0.16	0.031	0.13	0.020
L-アラニン	0.61	0.061	0.65	0.047	0.64	0.032
L-バリン	0.71	0.063	0.70	0.049	0.68	0.034
10						
L-シスチン	0	0	0	0	0	0
L-メチオニン	0.72	0.075	0.75	0.048	0.75	0.037
L-イソロイシン	0.30	0.043	0.31	0.032	0.33	0.022
L-ロイシン	2.85	0.108	2.95	0.078	2.92	0.054
L-チロシン	0.42	0.041	0.43	0.034	0.40	0.023
L-フェニルアラニン	0.63	0.062	0.68	0.049	0.68	0.033
L-トリプトファン	0.44	0.054	0.49	0.040	0.46	0.027
15						
L-リジン	1.22	0.101	1.27	0.071	1.25	0.046
L-ヒスチジン	0.29	0.042	0.31	0.032	0.28	0.021
L-アルギニン	1.14	0.085	1.15	0.067	1.10	0.042
L-プロリン	0.09	0.035	0.10	0.030	0.11	0.019
総遊離アミノ酸量	11.18	0.555	11.57	0.428	11.32	0.202

20

試験例 8

この試験は、試験例 7 とは異なる原料蛋白質及び分解条件で、加水分解を実施した場合の各方法を比較するために行った。

25

1) 試料の調製及び試験方法

蛋白質原料として牛乳カゼイン（商品名 A L A C I D。蛋白質含量 90%。ニュージーランドデーリーボード製）1kg を脱イオン水 9kg に懸濁させ、20% カセイソーダ溶液で pH を 7.0 に調整して溶解したこと、前記①の方法では、酵素分解を 9 時間で停止

したと、前記②の方法では、酵素分解を分解率が30%に達した時に停止したこと、及び前記③の本発明の方法では、分解液中の遊離リジン濃度を経時的に、かつ短時間で測定し、リジンの遊離率が32%に達した時点で酵素分解を停止したこと、を除き、試験例7
5 と同一の方法により加水分解をそれぞれ5回反復して実施し、合計15種類の試料を調製した。

2) 試験結果

この試験結果は表8に示すとおりである。表8から明らかなように、各方法で製造したペプチド混合物の各遊離アミノ酸量及び遊離
10 アミノ酸の合計量の平均値には多少の差はあったが、遊離した各アミノ酸の量の標準偏差及び遊離アミノ酸量の合計の標準偏差は、③の本発明の方法が最も小さく、安定しており、次いで②の方法であり、①の方法は最も変動が大きく製造上品質が不安定であることが認められた。

15

20

25

表 8

アミノ酸	①の方法 遊離アミノ酸量 (g/100g)		②の方法 遊離アミノ酸量 (g/100g)		③本発明の方法 遊離アミノ酸量 (g/100g)	
	平均値	標準偏差	平均値	標準偏差	平均値	標準偏差
5						
L-アスパラギン酸	0.22	0.048	0.26	0.022	0.24	0.021
L-スレオニン	0.60	0.061	0.64	0.043	0.64	0.033
L-セリン	0.93	0.079	0.95	0.052	0.94	0.037
L-グルタミン酸	0.57	0.061	0.60	0.044	0.57	0.029
L-グリシン	0.20	0.041	0.21	0.031	0.21	0.019
L-アラニン	0.41	0.053	0.42	0.038	0.41	0.025
L-バリン	0.95	0.068	0.97	0.050	0.98	0.037
10						
L-シスチン	0	0	0	0	0	0
L-メチオニン	1.00	0.089	1.09	0.069	1.05	0.044
L-イソロイシン	1.02	0.088	1.00	0.073	1.02	0.041
L-ロイシン	3.53	0.131	3.68	0.099	3.61	0.066
L-チロシン	0.85	0.069	0.89	0.051	0.89	0.034
L-フェニルアラニ	1.72	0.106	1.81	0.076	1.76	0.051
L-トリプトファン	0.31	0.041	0.36	0.033	0.35	0.022
15						
L-リジン	2.40	0.121	2.42	0.084	2.42	0.058
L-ヒスチジン	0.71	0.062	0.73	0.047	0.71	0.032
L-アルギニン	1.88	0.111	1.95	0.081	1.91	0.055
L-プロリン	0.17	0.046	0.20	0.031	0.21	0.020
総遊離アミノ酸量	17.47	0.751	18.18	0.511	17.92	0.355

20

試験例 9

この試験は、試験例 7 及び試験例 8 とは異なる原料蛋白質及び分解条件で、加水分解を実施した場合の各方法を比較するために行った。

25

1) 試料の調製及び試験方法

蛋白質原料として大豆蛋白(商品名 SUPRO。蛋白含量 90%)。不二製油社製)に変更したこと、前記①の方法では、酵素分解を 6 時間で停止したこと、前記、②方法では、酵素分解を分解率が 1

3 %に達した時に停止したこと、及び前記③の本発明の方法では、
分解液中の遊離リジン濃度を経時的に、かつ短時間に測定し、リジ
ンの遊離率が21 %に達した時点で酵素分解を停止したこと、を除
き、試験例7と同一の方法により加水分解をそれぞれ5回反復して
5 実施し、合計15種類の試料を調製した。

2) 試験結果

この試験結果は表9に示すとおりである。表9から明らかなよう
に、各方法で製造したペプチド混合物の各遊離アミノ酸量及び遊離
アミノ酸の合計量の平均値には多少の差はあったが、遊離した各ア
10 ミノ酸の量の標準偏差及び遊離アミノ酸量の合計の標準偏差は、③
の本発明の方法が最も小さく、安定しており、次いで②の方法であ
り、①の方法は最も変動が大きく製造上品質が不安定であることが
認められた。

尚、蛋白質原料を畜肉、魚肉、卵等に変更して同様に試験したが
15 、いずれの場合も遊離アミノ酸組成及び遊離アミノ酸量は、本発明
の方法が最も変動が少なく、安定していることが判明した。

20

25

表 9

アミノ酸	①の方法 遊離アミノ酸量 (g/100g)		②の方法 遊離アミノ酸量 (g/100g)		③本発明の方法 遊離アミノ酸量 (g/100g)	
	平均値	標準偏差	平均値	標準偏差	平均値	標準偏差
5 L-アスパラギン酸	0.15	0.033	0.14	0.029	0.10	0.018
L-スレオニン	0.27	0.035	0.20	0.033	0.22	0.019
L-セリン	0.94	0.101	0.91	0.079	0.94	0.053
L-グルタミン酸	0.22	0.035	0.18	0.026	0.18	0.015
L-グリシン	0.43	0.042	0.42	0.033	0.43	0.023
L-アラニン	0.93	0.075	0.87	0.051	0.89	0.035
L-バリン	0.37	0.043	0.36	0.033	0.35	0.022
10 L-シスチン	0	0	0	0	0	0
L-メチオニン	0.90	0.078	0.88	0.052	0.91	0.037
L-イソロイシン	0.52	0.054	0.51	0.037	0.52	0.025
L-ロイシン	1.09	0.089	1.01	0.063	1.06	0.043
L-チロシン	0.87	0.071	0.85	0.055	0.85	0.037
L-フェニルアラニン	0.91	0.073	0.89	0.056	0.88	0.036
L-トリプトファン	0.17	0.039	0.08	0.029	0.11	0.016
L-リジン	1.13	0.077	1.11	0.061	1.13	0.043
15 L-ヒスチジン	0.35	0.043	0.28	0.031	0.31	0.021
L-アルギニン	2.32	0.131	2.24	0.099	2.22	0.059
L-プロリン	0.18	0.035	0.10	0.027	0.08	0.015
総遊離アミノ酸量	11.75	0.539	11.03	0.417	11.18	0.200

20

試験例 10

この試験は、特定の遊離アミノ酸の測定方法を調べるために行った。

25

1) 試料の調製及び試験方法

バイオテックアナライザー（旭化成工業社製）の代わりに H P L C（島津製作所製）を用いて経時的に、かつ短時間で分解液の遊離リジンの量を測定したこと以外は、前記試験例 7 の③の方法と同一の方法により乳清蛋白質からペプチド混合物を調製した。

2) 試験結果

この試験結果は表 10 に示すとおりである。表 10 から明らかなように、分解液の遊離リジンの量をバイオテックアナライザーで測定した場合も、HPLC で測定した場合も、各アミノ酸の遊離量の
5 平均値及び遊離アミノ酸量の合計の平均値は異なるが、各アミノ酸の遊離量の標準偏差及び遊離アミノ酸量の合計の標準偏差は、両者に大差のないことが認められた。従って、これら遊離アミノ酸量の
10 いずれの測定方法も、本発明に使用し得ることが判明した。尚、蛋白質の種類及び加水分解条件を変更して試験したが、ほぼ同様な結果が得られた。

15

20

25

表 1 0

アミノ酸	バイオテックアナライザーで測定 遊離アミノ酸量 (g/100g)		HPLCで測定 遊離アミノ酸量 (g/100g)	
	平均値	標準偏差	平均値	標準偏差
5				
L-アスパラギン酸	0.16	0.021	0.18	0.020
L-スレオニン	0.54	0.030	0.51	0.031
L-セリン	0.57	0.029	0.59	0.027
L-グルタミン酸	0.32	0.021	0.33	0.022
L-グリシン	0.13	0.020	0.15	0.021
10				
L-アラニン	0.64	0.032	0.65	0.033
L-バリン	0.68	0.034	0.68	0.031
L-シスチン	0	0	0	0
L-メチオニン	0.75	0.037	0.77	0.037
L-イソロイシン	0.33	0.022	0.31	0.023
L-ロイシン	2.92	0.054	2.88	0.051
L-チロシン	0.40	0.023	0.42	0.019
15				
L-フェニルアラニン	0.68	0.033	0.72	0.031
L-トリプトファン	0.46	0.027	0.44	0.024
L-リジン	1.25	0.046	1.25	0.045
L-ヒスチジン	0.28	0.021	0.29	0.021
L-アルギニン	1.10	0.042	1.15	0.047
L-プロリン	0.11	0.019	0.13	0.021
20				
総遊離アミノ酸量	11.32	0.202	11.45	0.212

25 試験例 1 1

この試験は、測定する特定の遊離アミノ酸の種類を調べるために行った。

1) 試料の調製及び試験方法

HPLC (島津製作所製) を用いて経時的に、かつ短時間で分解

液の遊離フェニルアラニンの量を測定し、遊離フェニルアラニン量が25%に達した時点で酵素分解を停止したことを除き、試験例8の③の方法と同一の方法によりカゼインからペプチド混合物を調製した。

5 2) 試験結果

この試験結果は表11に示すとおりである。表11から明らかに、分解液の遊離フェニルアラニンの量を測定した場合も、各アミノ酸の遊離量の標準偏差及び遊離アミノ酸量の合計の標準偏差は小さく、カゼインから品質の一定したペプチド混合物が、得られることが認められた。尚、蛋白質の種類及び加水分解条件を変更して試験したが、ほぼ同様な結果が得られた。

10

15

20

25

表 1 1

アミノ酸	遊離アミノ酸量 (g/100g)	
	平均値	標準偏差
5		
L-アスパラギン酸	0.12	0.018
L-スレオニン	0.36	0.022
L-セリン	0.54	0.025
L-グルタミン酸	0.36	0.020
L-グリシン	0.13	0.017
L-アラニン	0.25	0.019
10		
L-バリン	0.63	0.033
L-シスチン	0	0
L-メチオニン	0.68	0.037
L-イソロイシン	0.61	0.033
L-ロイシン	2.14	0.057
L-チロシン	0.58	0.024
L-フェニルアラニン	1.04	0.041
15		
L-トリプトファン	0.18	0.017
L-リジン	1.37	0.047
L-ヒスチジン	0.39	0.021
L-アルギニン	1.21	0.044
L-プロリン	0.10	0.016
20		
総遊離アミノ酸量	10.69	0.213

試験例 1 2

25 この試験は、前記試験例 1 1 と同様に測定する特定の遊離アミノ酸の種類を変更して試験した。

1) 試料の調製及び試験方法

HPLC (島津製作所製) を用いて経時的に、かつ短時間で分解液の遊離ロイシンの量を測定し、遊離ロイシン量が 10 % に達した

時点で酵素分解を停止したことを除き、試験例 9 の③の方法と同一の方法により大豆蛋白質からペプチド混合物を調製した。

2) 試験結果

この試験結果は表 1 2 に示すとおりである。表 1 2 から明らかなように、分解液の遊離ロイシンの量を測定した場合も、各アミノ酸の遊離量の標準偏差及び遊離アミノ酸量の合計の標準偏差は小さく、大豆蛋白質から品質の一定したペプチド混合物が、得られることが認められた。また、遊離アルギニンの量を測定した場合についても、ほぼ同様の結果が得られた。測定する特定アミノ酸の種類を前記ロイシン及びアルギニン以外のアミノ酸に変更した場合、又は、蛋白質の種類及び加水分解条件を変更した場合についても試験したか、ほぼ同様な結果が得られた。

表 1 2

アミノ酸	遊離アミノ酸量 (g/100g)	
	平均値	標準偏差
5		
L-アスパラギン酸	0.10	0.019
L-スレオニン	0.15	0.021
L-セリン	0.63	0.033
L-グルタミン酸	0.13	0.020
L-グリシン	0.28	0.022
10		
L-アラニン	0.63	0.035
L-バリン	0.22	0.021
L-シスチン	0	0
L-メチオニン	0.65	0.034
L-イソロイシン	0.35	0.021
L-ロイシン	0.72	0.035
L-チロシン	0.58	0.028
15		
L-フェニルアラニン	0.61	0.031
L-トリプトファン	0.10	0.018
L-リジン	0.81	0.036
L-ヒスチジン	0.21	0.017
L-アルギニン	1.22	0.045
L-プロリン	0.08	0.015
20		
総遊離アミノ酸量	7.47	0.187

参考例 3

- 25 コーンスティープリカー 20 部（重量。以下同じ）に水道水 10
 0 部及び石灰 5 部を添加し、コーンスティープリカーに含まれてい
 る酸を中和し、濾過助剤としてセライト 50 部を添加して濾過し、
 濾液 A を得た。これとは別に、フィッシュリバー 20 部、モラセス 3
 5 部及び水道水 200 部の混合液にセライト 50 部を添加して濾過

し、濾液 B を得た。

前記濾液 A 及び濾液 B 当量混合液 500 部にグルコース 5 部、リン酸一カリウム 2.5 部、リン酸二カリウム 2.5 部及び酢酸ナトリウム 5 部を添加し、30%水酸化ナトリウムで pH を 6.4 に調整し、水を添加して 1000 部に調整した。

滅菌した前記組成の培地 101 にラクトバシラス・ヘルベティカスを培養し、得られた培養液を遠心分離して乳酸菌菌体を回収し、滅菌水に菌体を懸濁し、遠心分離して乳酸菌菌体を回収する操作を 2 回反復して菌体を洗浄し、のち 20% の濃度で菌体を滅菌水に懸濁し、超音波破砕機（ブランソン社製。SONIFIER model 250）により菌体を破砕し、凍結乾燥し、乳酸菌由来のエキソペプチダーゼ粉末約 25 g を得た。

試験例 13

この試験は、従来から採用されているペプチド混合物の製造方法、即ち、④反応時間を指標にして酵素分解を停止する方法、⑤分解率を指標にして酵素分解を停止する方法、及び⑥本発明の方法〔酵素膜センサー（バイオテックアナライザー。旭化成工業社製）〕とにより、ペプチド混合物を製造し、得られたペプチド混合物中の遊離 Phe 量、及びこのペプチド混合物から遊離 Phe 量を除去して得られる Phe 含量の少ないペプチド混合物の Phe 含量に及ぼす影響を比較検討した。

1) 試料の調製

前記④の方法では、酵素分解反応を 15 時間で停止したこと、前記⑤の方法では、酵素分解を分解率が 30% に達したときに停止したこと、及び前記⑥の本発明の方法では、分解液中の遊離 Phe 濃度を経時的に、かつ短時間で測定し、Phe の遊離率が 90% に達した時点で酵素分解を停止したことを除き、実施例 12 と同一の方法により牛乳乳清蛋白質溶液の加水分解をそれぞれ 5 回反復して実

施し、合計 15 種類のペプチド混合物を調製した。更に、これらの 3 種類の方法により得られた分解液から、それぞれ、実施例 12 と同一の方法により遊離 P h e を除去し、試料を調製した。

2) 試験方法

- 5 各分解液の遊離 P h e 量及び各試料中の全 P h e 量を、それぞれ前記の方法により測定し、5 回の結果の平均値と標準偏差を算出した。

3) 試験結果

- 10 この試験結果は表 13 に示すとおりである。表 13 から明らかなように、各方法で得られた試料の遊離 P h e 量の標準偏差は、⑥の本発明の方法が最も小さく、5 回反復して製造した場合でも品質が安定しており、次いで⑤の方法の変動が少なく、④の方法は最も変動が大きく品質が不安定であることが認められた。また、これらの 3 種類の方法により製造した試料中の全 P h e の値及び標準偏差も 15 、⑥の本発明の方法が最も低値を示し、品質が安定していることが認められた。尚、酵素の種類、原料蛋白質の種類を変更して試験したが、ほぼ同様の結果が得られた。

表 13

20 試 験 体	④ の 方 法		⑤ の 方 法		⑥ の 方 法	
	平均値	標準偏差	平均値	標準偏差	平均値	標準偏差
分解液の遊離 P h e	2.4	0.095	2.6	0.078	2.6	0.053
試 料 中 の 全 P h e	0.3	0.095	0.3	0.058	0.2	0.033

(注) 数値は、100g 当たりの g 数を表す。

25

試験例 14

この試験は、試験例 13 とは異なる原料蛋白質及び分解条件で加水分解を行った場合の各方法を比較するために実施した。

1) 試料の調製

前記試験例 13 の④の方法では、酵素分解反応を 20 時間で停止した
こと、前記試験例 13 の⑤の方法では、酵素分解を分解率が 35 %
に達したときに停止したこと、前記試験例 13 の⑥の本発明の
5 方法では、分解液中の遊離 P h e 濃度を経時的に、かつ短時間で測定し、
P h e の遊離率が 90 % に達した時点で酵素分解を停止したこと、
を除き、実施例 13 と同一の方法により牛乳カゼインの加水分解をそれぞれ
5 回反復して実施し、合計 15 種類の分解液を調製した。更に、これらの
3 種類の方法により得られた分解液から、それぞれ、実施例 13 と同一の
10 方法により遊離 P h e を除去して試料を調製した。

2) 試験方法

試験例 13 と同一の方法によった。

3) 試験結果

この試験結果は表 14 に示すとおりである。表 14 から明らかな
15 ように、各方法で製造した分解液の遊離 P h e 量の標準偏差は、⑥
の本発明の方法が最も小さく、5 回反復して製造した場合でも品質
が安定しており、次いで⑤の方法の変動が少なく、④の方法は最も
変動が大きく品質が不安定であることが認められた。また、これら
20 の 3 種類の方法により製造した試料中の全 P h e の値及び標準偏差
も、⑥の本発明の方法が最も低値を示し、品質が安定していることが
認められた。

尚、酵素の種類、原料蛋白質の種類を変更して試験したが、ほぼ
同様の結果が得られた。

25

表 1 4

被 検 体	④ の 方 法		⑤ の 方 法		⑥ の 方 法	
	平均値	標準偏差	平均値	標準偏差	平均値	標準偏差
分解液の遊離Phe	3.6	0.135	3.5	0.087	3.5	0.061
試料中の全Phe	0.4	0.112	0.3	0.052	0.3	0.035

(注) 数値は、100g当たりのg数を表す。

10 発明を実施するための最良の形態

次に実施例を示して本発明を更に詳述するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

実施例 1

純度75%の乳清蛋白質粉末(カリフォルニア・プロテイン社製) 1kgを、脱イオン水9kgに溶解し、75℃に15秒間保持して殺菌し、pHを9.0に調整し、プロテアーゼNアマノ(天野製薬社製) 180万PUN単位(乳清蛋白質1g当たり2400PUN単位)及び前記参考例1と同一の方法で調製したラクトバシラス・ヘルベティカス菌体破砕物6.8万活性単位(乳清蛋白質1g当たり90活性単位)を添加し、50℃に保持して加水分解し、バイオテックアナライザー(旭化成工業社製)を用いて経時的に遊離リジンの量を測定し、遊離リジン量が14%に達した時点で、80℃で6分間加熱して酵素を失活させ、冷却し、のちクエン酸でpHを6.0に調整し、分画分子量10,000の限外濾過膜(日東電工社製)で限外濾過し、乳清蛋白質加水分解物を5.9%含有する溶液約16kgを得た。

得られた乳清蛋白質加水分解物を前記試験方法により試験した結果の一部を図1、図2及び図3に示す。これらの結果、乳清蛋白質加水分解物は、分子量5,000~10,000ダルトンの画分が

、全加水分解物の 0.3%、抗原残存活性が 10^{-6} 以下、リジンの遊離率が 14%、遊離アミノ酸含量 11%、アンモニア含有量が 0.07%、10% 溶液の透過率が 98%、5% 溶液の pH 未調整及び pH 4 における 120°C、10 分間の加熱にも安定であり、 α -トコフェロールと同等の抗酸化活性を有した。また、前記試験方法により試験したアミノ酸組成（乳清蛋白加水分解物 1 g 当たり）は次のとおりであった。

	L-アラニン	52.8 (mg)
	L-アルギニン	23.4
10	L-アスパラギン酸（L-アスパラギンを含む）	102.6
	L-システイン	17.1
	L-グルタミン酸（L-グルタミンを含む）	185.1
	L-グリシン	18.8
	L-ヒスチジン	17.7
15	L-イソロイシン	59.9
	L-ロイシン	100.1
	L-リジン	94.6
	L-メチオニン	15.8
	L-フェニルアラニン	29.5
20	L-プロリン	61.4
	L-セリン	49.2
	L-スレオニン	70.3
	L-トリプトファン	16.7
	L-チロシン	26.1
25	L-バリン	54.7

実施例 2

純度 85% の乳清蛋白質粉末（デンマーク・プロテイン社製）1 kg を、脱イオン水 19 kg に溶解し、pH を 10 に調整し、市販

のトリプシン（ノボノルディスク社製）を11万PUN単位（乳清蛋白質1g当たり130PUN単位）、プロテアーゼNアマノ（天野製薬社製）180万PUN単位（乳清蛋白質1g当たり2100PUN単位）及び前記参考例1と同様の方法で調製したラクトバシ
5 ラス・ブルガリカス菌体破砕物5.1万活性単位（乳清蛋白質1g当たり60活性単位）を添加し、40℃で加水分解し、バイオテックアナライザー（旭化成工業社製）を用いて経時的に遊離リジンの量を測定し、遊離リジン量が17%に達した時点で、130℃で2
10 5に調整し、分画分子量3,000の限外濾過膜（旭化成工業社製）で限外濾過し、濃縮し、噴霧乾燥し、粉末状の乳清蛋白質加水分解物約800gを得た。

得られた乳清蛋白質加水分解物を前記の試験方法により試験した結果、分子量5,000～10,000ダルトンの画分が、全加水
15 分解物の0.2%、抗原残存活性が 10^{-6} 以下、リジンの遊離率が17%、遊離アミノ酸含量13%、アンモニア含有量が0.04%、10%溶液の透過率が99%、5%溶液のpH未調整及びpH4における120℃、10分間の加熱にも安定であり、 α -トコフェロールと同等の抗酸化活性を有した。

20

実施例3

純度90%の乳清蛋白質粉末（バイオボール社製）1kgを、脱イオン水19kgに溶解し、75℃に15秒間保持して殺菌し、pHを8.0に調整し、市販のパパイン（天野製薬社製）を10万P
25 UN単位（乳清蛋白質1g当たり110PUN単位）、ニュートラーゼ（ノボノルディスク社製）220万PUN単位（乳清蛋白質1g当たり2400PUN単位）及び前記参考例1と同様の方法で調製したビフィドバクテリウム・プレーベ菌体破砕物9万活性単位（乳清蛋白質1g当たり100活性単位）を添加し、50℃に保持し

て加水分解し、バイオテックアナライザー（旭化成工業社製）を用いて経時的に遊離リジンの量を測定し、遊離リジン量が20%に達した時点で、85℃で15分間加熱して酵素を失活させ、冷却し、のちクエン酸でpHを7.0に調整し、分画分子量10,000の限外濾過膜（日東電工社製）で限外濾過し、濃縮し、噴霧乾燥し、粉末状の乳清蛋白質加水分解物約800gを得た。

得られた乳清蛋白質加水分解物を前記試験方法により試験した結果、分子量5,000～10,000ダルトンの画分が、全加水分解物の0.3%、抗原残存活性が 10^{-6} 以下、リジンの遊離率が20%、遊離アミノ酸含量15%、アンモニア含有量が0.09%、10%溶液の透過率が98%、5%溶液のpH未調整及びpH4における120℃、10分間の加熱にも安定であり、 α -トコフェロールと同等の抗酸化活性を有した。

15 実施例 4

純度70%の乳清蛋白質粉末（ミライ社製）1kgを、脱イオン水5.7kgに溶解し、pHを9.0に調整し、ビオブラーゼ6,000S（長瀬生化学工業社製）160万PUN単位（乳清蛋白質1g当たり2000PUN単位）及び前記参考例1と同様の方法で調製したストレプトコッカス・ラクチス菌体破砕物6.3万活性単位（乳清蛋白質1g当たり90活性単位）を添加し、45℃で加水分解し、バイオテックアナライザー（旭化成工業社製）を用いて経時的に遊離リジンの量を測定し、遊離リジン量が19%に達した時点で、130℃で2秒間加熱して酵素を失活させ、冷却し、のちクエン酸でpHを7.0に調整し、分画分子量10,000の限外濾過膜（旭化成社製）で限外濾過し、乳清蛋白質加水分解物を8.4%含有する溶液約11kgを得た。

得られた乳清蛋白質加水分解物を前記の試験方法により試験した結果、分子量5,000～10,000ダルトンの画分が、全加水

分解物の 0.9%、抗原残存活性が 10^{-6} 以下、リジンの遊離率が 1.9%、遊離アミノ酸含量 14.5%、アンモニア含有量が 0.10%、10% 溶液の透過率が 98%、5% 溶液の pH 未調整及び pH 4 における 120°C、10 分間の加熱にも安定であり、 α -トコフェロールと同等の抗酸化活性を有した。

実施例 5

純度 80% の乳清蛋白質粉末（ニュージーランド・デーリー・ボード製）1 kg を、脱イオン水 12.3 kg に溶解し、75°C に 15 秒間保持して殺菌し、pH を 8.5 に調整し、市販のパパイン（天野製薬社製）を 8 万 PUN 単位（乳清蛋白質 1 g 当たり 100 PUN 単位）、ビオプラゼ（長瀬生化学工業社製）220 万 PUN 単位（乳清蛋白質 1 g 当たり 2700 PUN 単位）及び前記参考例 1 と同様の方法で調製したストレプトコッカス・クレモリス菌体破砕物 5.6 万活性単位（乳清蛋白質 1 g 当たり 70 活性単位）を添加し、pH を 6.5 に保持して 55°C で加水分解し、バイオテックアナライザー（旭化成工業社製）を用いて経時的に遊離リジンの量を測定し、遊離リジン量が 17% に達した時点で、90°C で 5 分間加熱して酵素を失活させ、冷却し、のちクエン酸で pH を 5.5 に調整し、分画分子量 10,000 の限外濾過膜（日東電工社製）で限外濾過し、濃縮し、噴霧乾燥し、粉末状の乳清蛋白質加水分解物約 800 g を得た。

得られた乳清蛋白質加水分解物を前記試験方法により試験した結果、分子量 5,000 ~ 10,000 ダルトンの画分が、全加水分解物の 0.3%、抗原残存活性が 10^{-6} 以下、リジンの遊離率が 1.7%、遊離アミノ酸含量 13%、アンモニア含有量が 0.11%、10% 溶液の透過率が 99%、5% 溶液の pH 未調整及び pH 4 における 120°C、10 分間の加熱にも安定であり、 α -トコフェロールと同等の抗酸化活性を有した。

実施例 6

純度 70% の乳清蛋白質粉末（カリフォルニア・プロテイン社製）1 kg を、脱イオン水 7 kg に溶解し、pH を 8.0 に調整し、
5 ブロメライン（天野製薬社製）35 万 PUN 単位（乳清蛋白質 1 g 当たり 500 PUN 単位）、ニュートラーゼ（ノボノルディスク社製）230 万 PUN 単位（乳清蛋白質 1 g 当たり 3300 PUN 単位）及び前記参考例 1 と同様の方法で調製したラクトバシラス・ブルガリカス菌体破砕物 5.6 万活性単位（乳清蛋白質 1 g 当たり 80 活性単位）を添加し、47℃ で加水分解し、バイオテックアナライザー（旭化成工業社製）を用いて経時的に遊離リジンの量を測定し、
10 遊離リジン量が 17% に達した時点で、85℃ で 15 分間加熱して酵素を失活させ、冷却し、のちクエン酸で pH を 5.5 に調整し、分画分子量 10,000 の限外濾過膜（日東電工社製）で限外濾過し、濃縮し、噴霧乾燥し、粉末状の乳清蛋白質加水分解物約 8
15 00 g を得た。

得られた乳清蛋白質加水分解物を前記の試験方法により試験した結果、分子量 5,000 ~ 10,000 ダルトンの画分が、全加水分解物の 0.4%、抗原残存活性が 10^{-6} 以下、リジンの遊離率が 17%、遊離アミノ酸含量 13%、アンモニア含有量が 0.10%、
20 10% 溶液の透過率が 98%、5% 溶液の pH 未調整及び pH 4 における 120℃、10 分間の加熱にも安定であった。

実施例 7

純度 80% の乳清蛋白質粉末（デンマーク・プロテイン社製）1
25 kg を、脱イオン水 9 kg に溶解し、pH を 7.5 に調整し、市販のニュートラーゼ（ノボノルディスク社製）を 160 万 PUN 単位（乳清蛋白質 1 g 当たり 2000 PUN 単位）及び前記参考例 1 と同様の方法で調製したビフィドバクテリウム・プレーベ菌体破砕物 2.8 万活性単位（乳清蛋白質 1 g 当たり 35 活性単位）を添加し

、pH 7.5 に保持して 45℃ で加水分解し、バイオテックアナライザー（旭化成工業社製）を用いて経時的に遊離リジンの量を測定し、遊離リジン量が 12% に達した時点で、90℃ で 20 分間加熱して酵素を失活させ、冷却し、のちクエン酸で pH を 7.0 に調整し、分画分子量 3,000 の限外濾過膜（旭化成社製）で限外濾過し、濃縮し、噴霧乾燥し、粉末状の乳清蛋白質加水分解物約 800 g を得た。

得られた乳清蛋白質加水分解物を前記試験方法により試験した結果、分子量 5,000 ～ 10,000 ダルトンの画分が、全加水分解物の 0.4%、抗原残存活性が 10^{-6} 以下、リジンの遊離率が 12%、遊離アミノ酸含量 10%、アンモニア含有量が 0.09%、10% 溶液の透過率が 100%、5% 溶液の pH 未調整及び pH 4 における 120℃、10 分間の加熱にも安定であった。

15 実施例 8

乳清蛋白質含量 75% の市販乳清蛋白質粉末（カリフォルニア・プロテイン社製）1 kg を、脱イオン水 9 kg に溶解し、70℃ に 5 分間保持して殺菌し、pH を 9.0 に調整し、市販のプロテアーゼ N アマノ（天野製薬社製）150 万 PUN 単位（乳清蛋白質 1 g 当たり 2000 PUN 単位）及び前記参考例 3 と同一の方法で調製したラクトバシラス・ヘルペチカス菌体破砕物 4 万活性単位（乳清蛋白質 1 g 当たり 60 活性単位）を添加し、50℃ に保持して加水分解を開始し、バイオテックアナライザー（旭化成工業社製）を用いて経時的に、かつ短時間で遊離リジンの量を測定し、遊離リジン量が 14% に達した時点で、80℃ で 6 分間加熱して酵素を失活させ、酵素分解を停止させ、のち常法により凍結乾燥し、乳清蛋白質からペプチド混合物約 950 g を得た。

前記の製造法を 2 回反復して得られたペプチド混合物を、前記試験方法により試験した結果、各遊離アミノ酸の量及び遊離アミノ酸

の合計量にはほとんど差異が認められなかった。

実施例 9

蛋白質含量 80% の市販小麦蛋白粉末（理研ビタミン社製。エマ
ソフト EX-100）1 kg を、脱イオン水 9 kg に溶解し、pH
を 7.0 に調整し、70℃ で 5 分間保持して殺菌した。この小麦蛋
白質溶液に市販のパンクレアチン（天野製薬社製）を 200 万 P U
N 単位（小麦蛋白質 1 g 当たり 2500 P U N 単位）及び前記参考
例 3 と同一の方法で調製したラクトバシラス・ヘルペチカス菌体破
砕物 6 万活性単位（小麦蛋白質 1 g 当たり 75 活性単位）を添加し
、50℃ に保持して加水分解を開始し、バイオテックアナライザー
（旭化成工業社製）を用いて経時的に、かつ短時間で遊離リジンの
量を測定し、遊離リジン量が 34% に達した時点で、80℃ で 10
分間加熱して酵素を失活させ、酵素分解を停止させ、のち凍結乾燥
し、小麦蛋白質からペプチド混合物約 950 g を得た。

前記の製造法を 2 回反復して得られたペプチド混合物を、前記試
験方法により試験した結果、各遊離アミノ酸の量及び遊離アミノ酸
の合計量にはほとんど差異が認められなかった。

20 実施例 10

蛋白質含量 80% の市販小麦蛋白粉末（理研ビタミン社製。エマ
ソフト EX-100）500 g 及び蛋白質含量 90% の市販大豆蛋
白粉末（不二製油社製。商品名 SUPRO）500 g を脱イオン水
9 kg に溶解し、pH を 7.0 に調整し、70℃ で 5 分間保持して
殺菌した。この混合蛋白質溶液に市販のパンクレアチン（天野製薬
社製）85 万 P U N 単位（蛋白質 1 g 当たり 1000 P U N 単位）
、プロテアーゼ N アマノ（天野製薬社製）170 万 P U N 単位（蛋
白質 1 g 当たり 2000 P U N 単位）及び前記参考例 3 と同一の方
法で調製したラクトバシラス・ヘルペチカス菌体破砕物 4 万活性単

位（蛋白質 1 g 当たり 47 活性単位）を添加し、50℃に保持して加水分解を開始し、HPLC（島津製作所製）を用いて経時的に、かつ短時間で遊離アルギニンの量を測定し、遊離アルギニン量が21%に達した時点で80℃で10分間加熱し、酵素を失活させ、酵素分解を停止させ、のち凍結乾燥し、ペプチド混合物約950gを得た。

前記の製造法を2回反復して得られたペプチド混合物を、前記試験方法により試験した結果、各遊離アミノ酸の量及び遊離アミノ酸の合計量にはほとんど差異が認められなかった。

10

実施例 1 1

乳清蛋白質含量75%の市販乳清蛋白質粉末（カリフォルニア・プロテイン社製）500g及び蛋白質含量90%の市販大豆蛋白質粉末（不二製油社製。商品名SUPRO）500gを脱イオン水9kgに溶解し、70℃に5分間保持して殺菌し、pHを9.0に調整し、市販のプロテアーゼNアマノ（天野製薬社製）250万PUN単位（蛋白質1g当たり4848PUN単位）及び前記参考例3と同一の方法で製造したラクトバシラス・ヘルベチカス菌体破砕物4万活性単位（蛋白質1g当たり48活性単位）を添加し、50℃に保持して加水分解を開始し、バイオテックアナライザー（旭化成工業社製）を用いて経時的に、かつ短時間で遊離リジンの量を測定し、遊離リジン量が18%に達した時点で80℃で6分間加熱し、酵素を失活させ、酵素分解を停止させ、凍結乾燥し、ペプチド混合物約950gを得た。

15

20

前記の製造法を2回反復して得られたペプチド混合物を、前記試験方法により試験した結果、各遊離アミノ酸の量及び遊離アミノ酸の合計量にはほとんど差異が認められなかった。

25

実施例 1 2

市販の乳清蛋白質濃縮物（ラクプロダン 80。デンマークプロテイン社製。蛋白質含量 75%）100g を 10% の濃度で脱イオン水に溶解し、65℃ で 30 分間加熱殺菌し、45℃ に保持し、水酸化ナトリウムで pH を 8.5 に調整し、パンクレアチン F（天野製薬社製）15 万 PUN 単位（乳清蛋白質 1g 当たり 2000 PUN 単位）、プロテアーゼ N アマノ（天野製薬社製）15 万 PUN 単位（乳清蛋白質 1g 当たり 2000 PUN 単位）、アクチナーゼ AS（科研ファルマ社製）単位（乳清蛋白質 1g 当たり 5000 PUN 単位）、プロテアーゼ A アマノ（天野製薬社製）800 活性単位（乳清蛋白質 1g 当たり 10.7 活性単位）を添加し、加水分解を開始し、酵素膜センサー [バイオテックアナライザー（旭化成工業社製）] を用いて経時的に、かつ短時間でこの分解液の遊離 Phe 量を測定し、遊離 Phe 率が 90% に達した時点で 85℃、10 分間加熱して酵素を失活させ、酵素分解を停止し、セライト濾過法により沈殿物を除去し、常法により凍結乾燥し、ペプチド混合物約 7.3g を得た。

得られた凍結乾燥物 5g を 10% の濃度で水に溶解し、セファデックス G-10（ファルマシア社製）を充填した 5cm × 15cm カラムに通液し、脱イオン水を用いて溶出し、フェニルアラニン含量の少ないペプチド混合物を回収し、溶出液を凍結乾燥し、フェニルアラニン含量の少ないペプチド混合物約 2.2g を得た。

前記製造法を 3 回反復して得られたフェニルアラニン含量の少ないペプチド混合物を前記試験方法により試験した結果、Phe 含有量は全アミノ酸当たり 0.2% であり、3 回の製造における Phe の量にはほとんど差異が認められなかった。

実施例 13

市販牛乳カゼイン（ALACID。ニュージーランドデイリーボード製。蛋白質含量 90%）200g を脱イオン水に懸濁し、10

%水酸化ナトリウムでpH 8.0に調整して溶解し、脱イオン水で12%の濃度に調整し、90℃で5分間加熱殺菌し、50℃に保持し、パンクレアチンF（天野製薬社製）72万PUN単位（カゼイン蛋白質1g当たり4000PUN単位）を添加して加水分解を開始し、開始5時間後にアクチナーゼAS（科研ファルマ社製）90万単位（カゼイン蛋白質1g当たり5000PUN単位）を添加し、加水分解を継続し、HPLC（島津製作所製）を用いて、経時的に、かつ短時間でこの分解液の遊離Phe量を測定し、遊離Phe率が90%に達した時点で、85℃で10分間加熱して酵素を失活し、酵素分解を停止させ、分画分子量が3000ダルトンの限外濾過膜（旭化成工業社製）により沈殿物を除去し、常法により凍結乾燥し、ペプチド混合物約165gを得た。

得られた凍結乾燥物150gを20%の濃度で水に溶解し、粉末活性炭〔白鷺（武田薬品社製）〕35gを投入し、4℃で15時間静置し、のち濾過して活性炭を除去し、吸着樹脂（KS-35。北越炭素工業社製）190mlを充填したカラムに5ml/分の流速で通液し、溶出液を凍結乾燥し、フェニルアラニン含量の少ないペプチド混合物約112gを得た。

前記製造法を3回反復して得られたフェニルアラニン含量の少ないペプチド混合物を前記試験方法により試験した結果、Phe含有量は全アミノ酸当たり0.3%であり、3回の製造におけるPheの量にはほとんど差異が認められなかった。

実施例14

市販の乳清蛋白質濃縮物（ラクプロダン80。デンマークプロテイン社製。蛋白質含量75%）500g及び市販の大豆蛋白粉末（SUPRO。不二製油社製。蛋白質含量90%）500gを脱イオン水に10%の濃度で溶解し、70℃で5分間加熱殺菌し、55℃に保持し、水酸化カリウムでpHを9に調整し、パンクレアチンF

(天野製薬社製) 123万7500 PUN単位(蛋白質1g当たり1500 PUN単位)、パパインW-40(天野製薬社製) 165万PUN単位(蛋白質1g当たり2000 PUN単位)、アクチナーゼAS(科研ファルマ社製) 330万PUN単位(蛋白質1g当たり4000 PUN単位)及びプロテアーゼAアマノ(天野製薬社製) 16500活性単位(蛋白質1g当たり20活性単位)を添加して加水分解を開始し、酵素膜センサー(バイオテックアナライザー(旭化成工業社製))を用いて経時的に、かつ短時間でこの分解液の遊離Phe量を測定し、遊離Phe率が88%に達した時点で、90℃で10分間加熱して酵素を失活させ、セライト濾過法により沈殿物を除去し、常法により凍結乾燥し、ペプチド混合物約720gを得た。

得られた凍結乾燥物100gを10%の濃度で水に溶解し、セルロファインGCL-25(生化学工業社製)を充填した37cm×15cmカラムに通液し、脱イオン水を用いて溶出し、フェニルアラニン含量の少ないペプチド混合物を回収し、凍結乾燥し、フェニルアラニン含量の少ないペプチド混合物約52gを得た。

前記製造法を3回反復して得られたフェニルアラニン含量の少ないペプチド混合物を前記試験方法により試験した結果、Phe含有量は全アミノ酸当たり0.4%であり、3回の製造におけるPheの量にはほとんど差異が認められなかった。

産業上の利用可能性

以上詳述したように本発明の第1～2の発明は、風味良好な乳清蛋白加水分解物及びその製造法であり、本発明によって奏せられる効果は次のとおりである。

- 1) 本発明の乳清蛋白質加水分解物は、腸管吸収性において優れ、アミノ酸バランスが良好なので、消化吸収能の未熟な乳幼児又は消化吸収能が低下している高齢者、病人への蛋白質供給源用素材

として使用できる。

2) 本発明の乳清蛋白質加水分解物は、抗原残存活性がないので、アレルギー患者、アレルギー予防を目的として乳幼児、妊産婦、免疫機能の低下した病人への蛋白質供給源用素材として使用できる。

3) 本発明の乳清蛋白質加水分解物は、抗酸化作用を有し、熱安定性、透明性も高く、風味良好なので母乳強化組成物や経口経腸栄養剤の蛋白質供給源用素材として使用できる。

4) 本発明の方法により、広範な用途を有する乳清蛋白質加水分解物を製造することができる。

また、本発明の第3の発明は、ペプチド混合物の新規な製造法であり、本発明によって奏せられる効果は次のとおりである。

5) 各遊離アミノ酸の量及び遊離アミノ酸の合計量がほぼ一定のペプチド混合物が得られる。

6) 目的とするペプチド混合物が常に安定して得られる。

7) 一定品質のペプチド混合物を簡便に製造することができる。

更に、本発明の第4の発明は、フェニルケトン尿症患者の摂取に適当したフェニルアラニン含量の少ないペプチド混合物の新規な製造法であり、本発明の方法により、フェニルアラニン含有量が低い値で一定し、高品質の製品を簡便に製造することが可能であり、本発明方法により製造されるフェニルアラニン含有量の少ない一定品質のペプチド混合物は、従来製品にみられるような風味及び浸透圧上の欠点がなく、フェニルケトン尿症の乳幼児、成人、及び妊産婦の食事における蛋白源として広く利用できる。

請求の範囲

1. 純度が少なくとも70%（重量）の乳清蛋白質の加水分解物であって、次のa)～h)の理化学的性質；
 - a) 分子量5,000～10,000ダルトンの画分が、全加水分解物の1%（重量）未満であること、
 - b) 抗乳清蛋白質血清を用いたエライザ抑制試験法により測定した抗原残存活性が 10^{-5} 以下であること、
 - c) 加水分解物の全アミノ酸の量に対する遊離アミノ酸の量の割合が10～15%（重量）であること、
 - d) 乳清蛋白質に含まれる全リジンの量に対する遊離リジンの量の割合が12～20%（重量）であること、
 - e) アンモニア含量が0.2%（重量）以下であること、
 - f) 10%（重量）溶液を1cmのセル、540nmで測定した透過率が98%以上であること、
 - g) pH4～7の5%（重量）溶液を120℃で10分間加熱して沈殿を生じないこと、及び
 - h) 抗酸化活性を有すること、を有することを特徴とする風味良好な乳清蛋白加水分解物。
2. 純度が少なくとも70%（重量）の乳清蛋白質を15%（重量）以下の濃度で水に溶解し、該水溶液のpHを7.5～10に調整し、該水溶液にバシラス・サチリス(*Bacillus subtilis*)由来のエンドペプチダーゼ及び乳酸菌由来のエキソペプチダーゼの2種類の蛋白分解酵素を添加して加水分解を開始し、分解液中の遊離リジン量を経時的に測定し、出発原料である乳清蛋白質に含まれる全リジンの量に対する遊離リジンの量の割合が12～20%（重量）の範囲で加水分解を停止し、限外濾過して分子量10,000ダルトン以上の画分を完全に除去することを特徴とする風味良好な乳清蛋白加水分解物の製造法。
3. 一定品質のペプチド混合物の製造法であって、1種若しくは2

- 種以上の蛋白質からなる原料蛋白質の水溶液又は予め軽度に加水分解した原料蛋白質の水溶液に、1種若しくは2種以上の蛋白質分解酵素を添加し、原料蛋白質又は予め軽度に加水分解した原料蛋白質の加水分解を開始し、加水分解により分解液中に遊離した特定アミノ酸の量を経時的に、かつ短時間で測定し、原料蛋白質又は予め軽度に加水分解した原料蛋白質に含まれる特定アミノ酸の総量に対する遊離した特定アミノ酸の量の割合を算出し、その算出した値が予め設定された特定の範囲内に達したとき直ちに加水分解を停止することを特徴とするペプチド混合物の製造法。
- 5
4. 遊離した特定アミノ酸が、リジン、フェニルアラニン、ロイシン又はアルギニンである請求項3に記載のペプチド混合物の製造法。
- 10
5. フェニルアラニン含量の少ない一定品質のペプチド混合物の製造法であって、1種若しくは2種以上の蛋白質からなる原料蛋白質の水溶液又は予め軽度に加水分解した原料蛋白質の水溶液に、
- 15
- 1種又は2種以上の蛋白質分解酵素を添加し、原料蛋白質又は予め軽度に加水分解した原料蛋白質の加水分解を開始し、加水分解により分解液中に遊離したフェニルアラニンの量を経時的に、かつ短時間で測定し、原料蛋白質又は予め軽度に加水分解した原料蛋白質に含まれるフェニルアラニンの総量に対する遊離したフェニルアラニンの量の割合を算出し、その算出した値が予め設定された特定の範囲内に達したときに直ちに加水分解を停止し、分解液中の遊離したフェニルアラニンを除去することを特徴とするフェニルアラニン含量の少ないペプチド混合物の製造法。
- 20
6. 遊離したフェニルアラニンの量の測定が、酵素膜センサーを用いて行われる請求項5に記載のフェニルアラニン含量の少ないペプチド混合物の製造法。
- 25

要約書

本発明は、特異な理化学的性状を有する乳清蛋白加水分解物及びその製造法に係るものであり、更には、一定品質のペプチド混合物の製造法に関する。

上記乳清蛋白加水分解物は、純度が少なくとも70%（重量）の乳清蛋白質の加水分解物であって、分子量5,000～10,000ダルトンの画分が、全加水分解物の1%（重量）未満であること、抗乳清蛋白質血清を用いたエライザ抑制試験法により測定した抗原残存活性が 10^{-5} 以下であること、加水分解物の全アミノ酸の量に対する遊離アミノ酸の量の割合が10～15%（重量）であること、乳清蛋白質に含まれる全リジンの量に対する遊離リジンの量の割合が12～20%（重量）であること、アンモニア含量が0.2%（重量）以下であること、10%（重量）溶液を1cmのセル、540nmで測定した透過率が98%以上であること、pH4～7の5%（重量）溶液を120℃で10分間加熱して沈殿を生じないこと及び抗酸化活性を有することを特徴とする風味良好な乳清蛋白加水分解物、に係る。

上記乳清蛋白加水分解物は、消化吸収能の未熟な乳幼児又は消化吸収能が低下している高齢者、病人への蛋白質供給源用素材、乳幼児、妊産婦、免疫機能の低下した病人への蛋白質供給源用素材、また、母乳強化組成物や経口経腸栄養剤の蛋白質供給源用素材等として使用できる。

また、本発明の方法によれば、各遊離アミノ酸の量及び遊離アミノ酸の合計量がほぼ一定のペプチド混合物が常に安定して得られる。

1 / 3

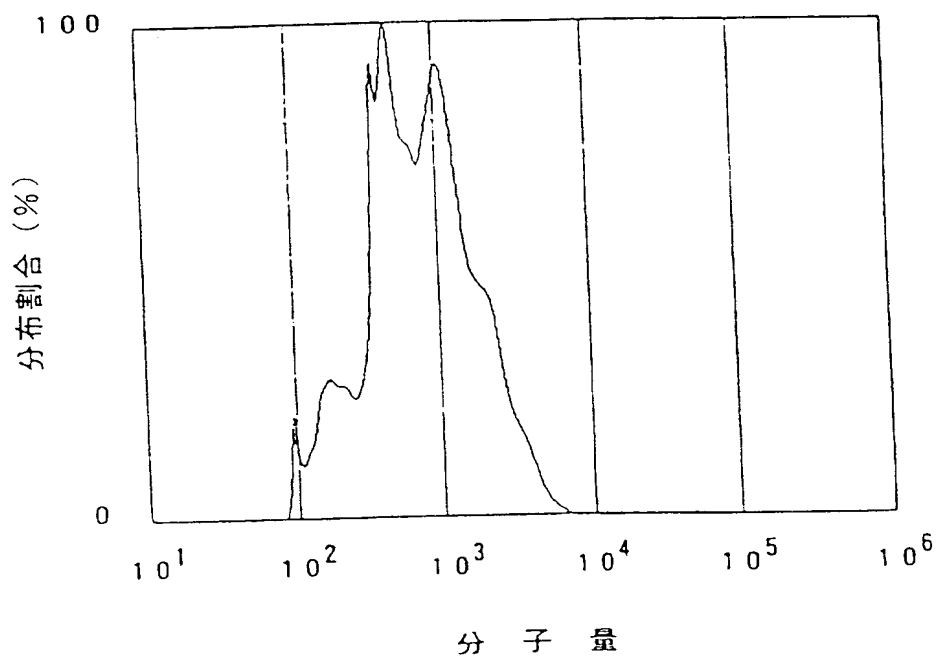


図 1

2 / 3

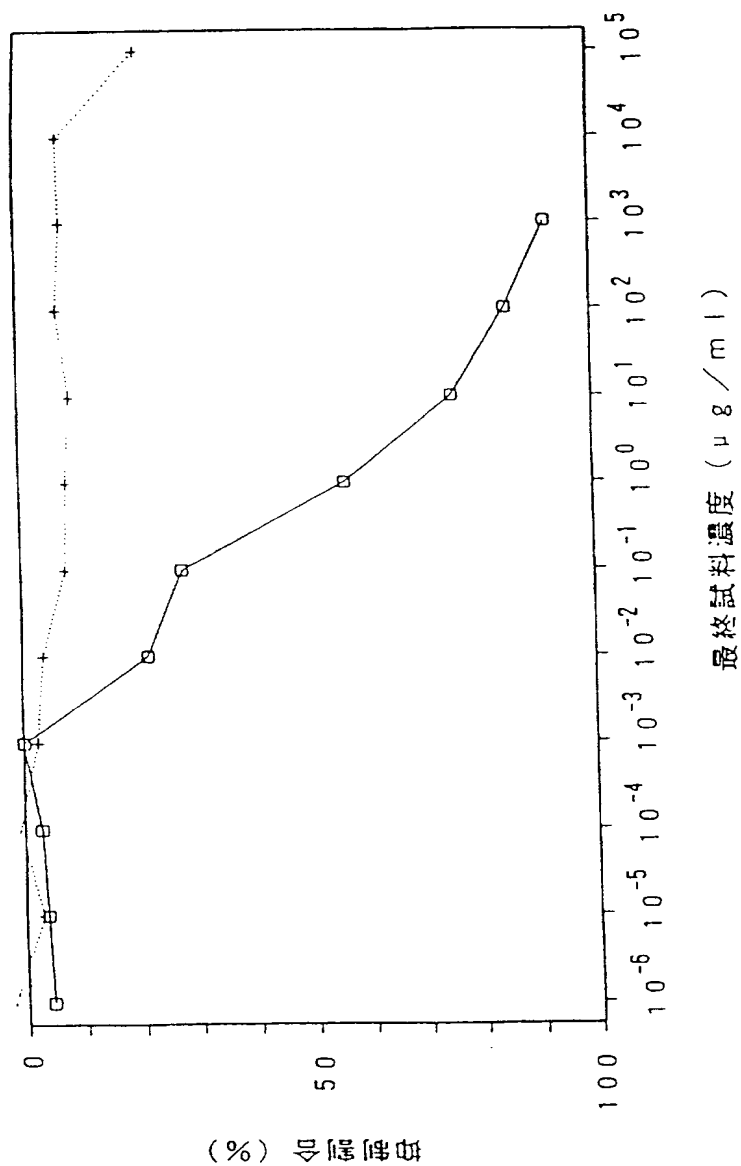


図 2

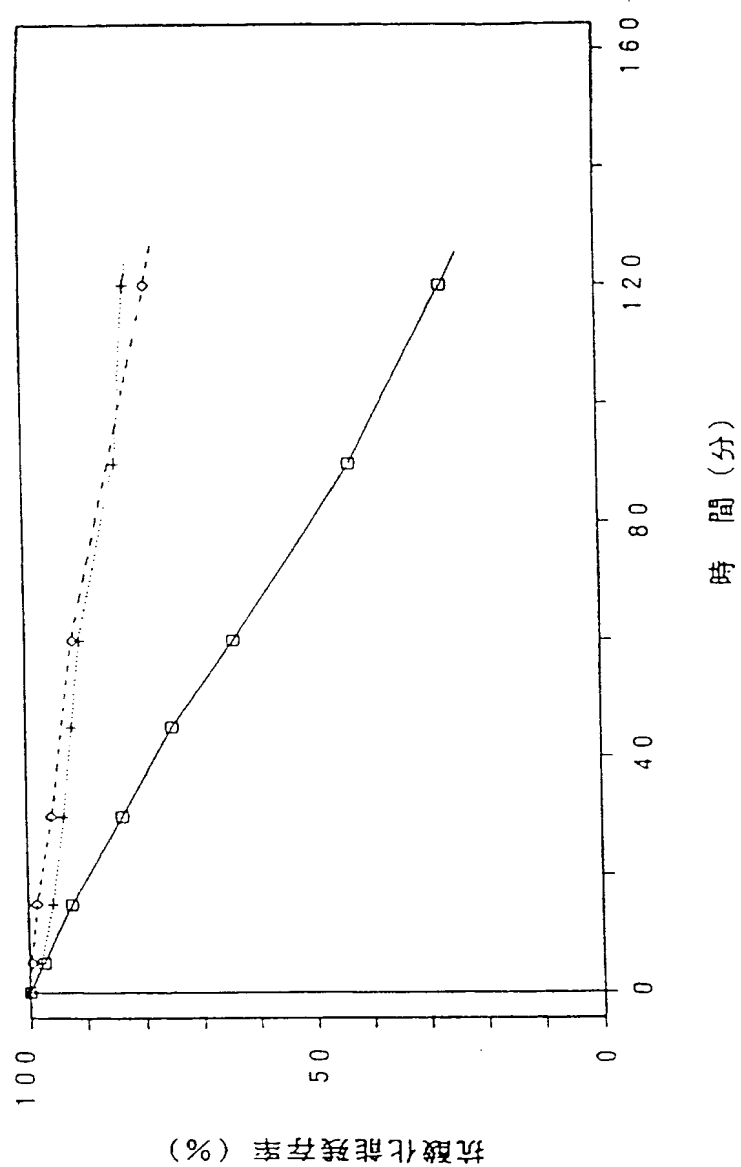


図 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP95/02109

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ A23J3/08, A23J3/34, A23C21/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ A23J3/08, A23J3/34, A23C21/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, WPI/L

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, A	JP, 7-115912, A1 (Terumo Corp.), May 9, 1995 (09. 05. 95) (Family: none)	1 - 6
A	JP, 5-276896, A1 (Meiji Milk Products Co., Ltd.), October 26, 1993 (26. 10. 93) (Family: none)	1 - 6
A	JP, 6-507547, A1 (Danmark Protein A/S), September 1, 1994 (01. 09. 94) & WO, 92/21248, A1 & AU, 9218827, A & NZ, 242963, A & NO, 9304310, A & EP, 588841, A1 & AU, 656977, B	1 - 6
A	JP, 4-248959, A1 (Morinaga Milk Industry Co., Ltd.), September 4, 1992 (04. 09. 92) (Family: none)	1 - 6
A	JP, 62-42931, A1 (Snow Brand Milk Products Co., Ltd.), February 24, 1987 (24. 02. 87) (Family: none)	1 - 6

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

January 10, 1996 (10. 01. 96)

Date of mailing of the international search report

January 30, 1996 (30. 01. 96)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

Printed from Mimosa

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁶ A 23 J 3/08, A 23 J 3/34, A 23 C 21/00		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁶ A 23 J 3/08, A 23 J 3/34, A 23 C 21/00		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
WPI, WPI/L		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, A	JP, 7-115912, A1 (テルモ株式会社), 9. 5月. 1995 (09. 05. 95) (ファミリーなし)	1-6
A	JP, 5-276896, A1 (明治乳業株式会社), 26. 10月. 1993 (26. 10. 93) (ファミリーなし)	1-6
A	JP, 6-507547, A1 (ダンマーク プロテイン アクティ ーゼルスラブ), 1. 9月. 1994 (01. 09. 94)	1-6
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日 若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日 の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と 矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のため に引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規 性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文 献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性 がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日	
10. 01. 96	30.01.96	
名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 高 堀 栄 二 ④	4 B 9 2 8 1
	電話番号 03-3581-1101 内線	3449

C (続き). 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	&WO, 92/21248, A1&AU, 9218827, A &NZ, 242963, A&NO, 9304310, A &EP, 588841, A1&AU, 656977, B JP, 4-248959, A1 (森永乳業株式会社), 4. 9月. 1992 (04. 09. 92) (ファミリーなし)	1-6
A	JP, 62-42931, A1 (富士乳業株式会社), 24. 2月. 1987 (24. 02. 87) (ファミリーなし)	1-6

様式PCT/ISA/210 (第2ページの続き) (1992年7月)

FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AT	Austria	FI	Finland	MN	Mongolia
AU	Australia	FR	France	MR	Mauritania
BB	Barbados	GA	Gabon	MW	Malawi
BE	Belgium	GB	United Kingdom	NL	Netherlands
BF	Burkina Faso	GN	Guinea	NO	Norway
BG	Bulgaria	GR	Greece	NZ	New Zealand
BJ	Benin	HU	Hungary	PL	Poland
BR	Brazil	IE	Ireland	PT	Portugal
CA	Canada	IT	Italy	RO	Romania
CF	Central African Republic	JP	Japan	RU	Russian Federation
CG	Congo	KP	Democratic People's Republic of Korea	SD	Sudan
CH	Switzerland	KR	Republic of Korea	SE	Sweden
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovak Republic
CM	Cameroon	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CS	Czechoslovakia	LU	Luxembourg	SU	Soviet Union
CZ	Czech Republic	MC	Monaco	TD	Chad
DE	Germany	MG	Madagascar	TG	Togo
DK	Denmark	ML	Mali	UA	Ukraine
ES	Spain			US	United States of America